

Université de Montréal

La proprotéine convertase PCSK9 : est-ce une protéase *en trans* ?

Par

Chady Sakr

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences en Biochimie

Février 2007

© Chady Sakr, 2007



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

La proprotéine convertase PCSK9 : est-ce une protéase *en trans* ?

Présenté par:

Chady Sakr

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Dr Claude Lazure

Directeur de recherche : Dr Nabil G. Seidah

Membre du jury : Dr Guy Boileau

Résumé

L'hypercholestérolémie familiale (FH) se traduit par des concentrations plasmatiques élevées de lipoprotéines de basse densité (LDL), par des dépôts de cholestérol dans les tendons et la peau (xanthomes), ainsi que dans les artères (athérome), provoquant des accidents cardiovasculaires prématurés. Il a été démontré que PCSK9 était la troisième cause de l'hypercholestérolémie familiale. Les études de souris KO *Pcsk9* ont fortement supporté l'hypothèse que son inhibition aurait des retombées cliniques. Or, jusqu'à présent, l'activité enzymatique de PCSK9 n'a jamais été prouvée autant *in vitro* qu'*ex vivo*. Basé sur son autoclivage, nous avons supposé que cette molécule pourrait agir comme protéase sur d'autres substrats. Nous avons construit une protéine de fusion composée d'un corps Fc et d'une queue C-terminale d'ACE₂. Nous avons incorporé une séquence de reconnaissance enzymatique, coiffée d'un épitope HA en N-terminal. Suite aux succès de cette construction dans le ciblage de la Furine, nous avons obtenu une construction similaire, *SN11CT-FL-ACE₂* pour fin d'analyses enzymatiques de PCSK9 et potentiellement identifier un inhibiteur potentiel par criblage de banques combinatoires de composés. Suite à des expériences d'immunofluorescence, de buvardage par western (bW), de biosynthèse et de CELISA, nous avons découvert que la séquence de ciblage de PCSK9, SSVFAQSIPWN, mise dans notre construction, n'était pas adéquate pour mettre en évidence l'activité enzymatique de PCSK9. Ceci nous mène à supposer que le véritable substrat de PCSK9 n'est probablement pas cette séquence. Alternativement, la chimère ne se retrouverait pas dans le compartiment cellulaire propice où PCSK9 serait active. Ceci différencierait davantage PCSK9 des autres PCs.

Mots clefs : PCSK9, proprotéine convertase, Furine, LDL-R, FC-ACE₂-

Fusion, ACE₂, activité enzymatique, inhibiteur

Abstract

Familial hypercholesterolemia is characterized by high plasma concentrations of low density lipoprotein (LDL), and deposition of cholesterol in tendons, skin (xanthomas) and in arteries (atheromas) causing premature cardiovascular disease. *PCSK9* is the third locus of familial hypercholesterolemia. *Pcsk9* knockout mice confirmed its degradative action on Ldlr. However, PCSK9's enzymatic activity remains elusive. Its structural resemblance to the other proprotein convertases and the fact that it autocatalytically cleaves its prosegment lead us to assume that it could act *in trans* as a protease. Consequently, we hypothesized that the substrate of this convertase may have a similar recognition sequence as that of the prosegment, a characteristic shared by other PCs. We constructed a recombinant cDNA expressing a fusion protein consisting of a Fc main body and an ACE₂ C-terminal tail. We incorporated bait enzymatic sequence fused by an N-terminal HA tag. Following our successful targeting of Furin by a similar construct, we incorporated the prosegment cleavage sequence into the bait region resulting in *SN1ICT-FL-ACE₂*. We hoped that this construct may reveal the PCSK9 enzymatic activity, which may be targeted in a combinatorial drug screen for potential identification of lead inhibitors. Immunofluorescence, Western blots (Wb), biosynthesis and CELISA assays revealed that the bait sequence ¹⁴⁷SSVFAQ¹⁵²SIPWN¹⁵⁷ exhibiting the zymogen processing site VFAQ¹⁵²↓ failed to reveal PCSK9's enzymatic activity. We conclude that either PCSK9 does not act as a protease, or endogenous PCSK9's substrate(s) is/are devoid of such sequence or our construct may not reach the subcellular compartment where PCSK9 would be active.

Key words: PCSK9, proprotein convertase, Furin, LDL-R, FC-ACE₂

Fusion, ACE₂, enzymatic activity, inhibitor.

Table des Matières

Résumé.....	I
Table des Matières.....	III
Liste des figures	V
Liste des Tableaux	VII
Liste des abréviations	VIII
Dédicace.....	XI
Remerciements.....	XII
 Chapitre I : Introduction	 1
1.1 La voie sécrétoire.	2
1.2 Les Proprotéines Convertases (PCs).....	15
1.3 La spécificité enzymatique des PCs.....	21
1.4 Les inhibiteurs des PCs	24
1.5 Les PCs atypiques.....	26
1.6 PCSK9	27
1.6.1 L'implication de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol	29
1.6.2 La régulation de PCSK9.....	30
1.7 Objectif de la recherche	44
Chapitre II: Matériels et Méthodes	33
2.1 Les constructions FC-ACE2-Fusion pour PCSK9	34
2.2 Culture cellulaire et transfection.....	40
2.3 Immunofluorescence et microscopie confocale	40
2.4 Solubilisation des protéines, Western blot et immunodétection	41
2.5 Biosynthèse des protéines de fusion SN11CT-FL-ACE ₂ et SN11 CT-FL-ACE ₂ V/A..	41
Chapitre III: Résultats	43
3.1 Caractérisation de la construction FC-ACE ₂ -Fusion	47
3.2 Amélioration du clivage de la construction.....	55
3.3 Démonstration du clivage par PCSK9	60
3.4 Biosynthèse des protéines de fusion SN11CT-FL-ACE ₂ et SN11 CT-FL-ACE ₂ V/A..	63

Chapitre IV: Discussion	66
4.1 <i>Caractérisation de la construction utilisée pour démontrer l'activité enzymatique de PCSK9.</i>	67
4.1.1 <i>Le test colorimétrique et l'inhibiteur de PCSK9</i>	68
4.2 <i>La problématique entre PCSK9 et la construction</i>	69
4.2.1 <i>Mécanisme de dégradation du LDL-R par la PCSK9</i>	71
4.2.2 <i>PCSK9 et sa colocalisation avec le LDL-R</i>	72
4.2.3 <i>L'activité et la régulation de PCSK9 dans la cellule</i>	73
4.2.4 <i>La séquence reconnue comme substrat de PCSK9</i>	74
 Conclusions	76
Bibliographie	79

Liste des figures

Figure 1: La voie sécrétoire cellulaire.....	3
Figure 2: Les protéines d'enrobage vésiculaire dans la voie sécrétoire et d'endocytose.....	5
Figure 3: L'endocytose des LDL et le recyclage du LDLR.....	11
Figure 4: L'ubiquitination et le protéasome.....	14
Figure 5: Arbre phylogénique des proprotéines convertases basé sur l'alignement des domaines catalytiques.....	15
Figure 6: Localisation cellulaire des proprotéines convertases.....	17
Figure 7: Représentation schématique des PC et de leurs homologues.....	18
Figure 8: Spécificité de coupure des proprotéines convertases.....	23
Figure 9: Représentation schématique de PCSK9.....	28
Figure 10: Régulation post-traductionnelle du LDLR par PCSK9.....	31
Figure 11: PCRs utilisées pour la fabrication des constructions <i>Fc-ACE₂-Fusion</i>	36
Figure 12: Constructions utilisées pour détecter l'activité enzymatique de NARC1/PCSK9.....	46
Figure 13: Immunofluorescence de <i>SN11</i> dans cellules HuH7.....	48
Figure 14: Immunofluorescence de <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> dans les cellules HuH7.....	48

Figure 15: Immunofluorescence double de <i>VII79</i> dans les cellules HuH7.....	50
Figure 16: Immunofluorescence double de <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> en condition non perméabilisante dans les cellules HuH7.....	51
Figure 17: Immunofluorescence double de <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> en condition perméabilisante dans les cellules HuH7.....	52
Figure 18: Immunobuvardage anti-HA HRP des constructions PCSK9.....	54
Figure 19: Effet du clivage des constructions PCSK9 dans les cellules HuH7.....	56
Figure 20: Effet du clivage des constructions PCSK9 dans les cellules HepG2.....	57
Figure 21: Effet du clivage de <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> lors de la surexpression de NARC-1/PCSK9 dans les HEK 293.....	59
Figure 22: Démonstration du clivage par PCSK9 dans les HuH7.....	61
Figure 23: Démonstration du clivage par PCSK9 dans les HepG2.....	62
Figure 24: Biosynthèse des <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> et <i>SN11V/A CT-FL-ACE₂</i> dans les cellules HuH7.....	64
Figure 25: Biosynthèse des <i>SN11CT-FL-ACE₂</i> et <i>SN11V/A CT-FL-ACE₂</i> dans les cellules HuH7 avec des marquages et des chasses.....	65

Liste des Tableaux

Tableau I : Amorce d'oligonucléotides utilisées pour les différentes PCRs afin d'obtenir la séquence PCSK9	34
Tableau II : Amorces utilisées pour les différentes PCRs pour l'allongement de la queue C-terminale d'ACE ₂ de <i>SN11</i>	37
Tableau III : Amorces utilisées pour les différentes PCRs pour la mutation de V→A (Valine en Alanine) de la séquence SSVFAQSIPWN	38

Liste des abréviations

α -MSH	<i>melanocyte-stimulating hormone</i>
ACTH	<i>adrenocorticotropin hormone</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	complexe promoteur de l'anaphase (<i>anaphase promotor complex</i>)
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
β -END	<i>β-endorphin</i>
β -LPH	<i>β-lipotropin</i>
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
bW	buvar dage par western
CL	cholestérol libre
COP I	<i>coat protein complex I</i>
COP II	<i>coat protein complex II</i>
CPD	carboxypeptidase D
CPE	carboxypeptidase E
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EC	ester de cholestérol
EDEM	<i>ER degradation-enhancing 1, 2-mannosidase-like protein</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i>
CELISA	<i>cell enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>

ERAD	<i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	domaine effecteur d'une immunoglobuline
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cell</i>
IDL	lipoprotéines de densité intermédiaire (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
INSIG	<i>insulin-induced protein</i>
Kex2	<i>Killer expression 2</i>
KO	<i>knockout</i>
LDL	lipoprotéines de basse densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LDL-R	<i>LDL receptor</i>
M6P	Mannose 6-phosphate
NARC-1	<i>neural apoptosis regulated convertase 1</i>
P	Domaine P
PACE4	<i>Paired basic amino acid cleaving enzyme 4</i>
PC	Proprotéine convertase
PC1	Proprotéine convertase 1
PC2	Proprotéine convertase 2
PC4	Proprotéine convertase 4
PC5	Proprotéine convertase 5
PC5A	Proprotéine convertase 5 isoforme A
PC5B	Proprotéine convertase 5 isoforme B
PC7	Proprotéine convertase 7
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PCSK9	<i>proprotein convertase subtilisin kexin 9</i>
PDX	<i>α1- antitrypsine Portland</i>
PL	phospholipides
POMC	proopiomélanocortine
Pro	prosegment
PRS	particule de reconnaissance du signal
PS	peptide signal
q-PCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RCG	réseau <i>cis</i> -golgien
RE	réticulum endoplasmique
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay buffer</i>
RPRS	récepteur du PRS
RTG	réseau <i>trans</i> -golgien
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SKI -1	<i>subtilisin-kexin isozyme-1</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
SREBP2	<i>Sterol regulatory element binding protein 2</i>
TG	triglycérides
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
VLDL	lipoprotéines de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)
Wt	<i>Wild Type</i> (type sauvage)

*Je dédie ce mémoire à ma famille,
soit à mes parents Georges et Victoria
et à mes deux sœurs Rouba et Lara.*

Remerciements

Je remercie le Dr. Nabil G. Seidah pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le support intellectuel qu'il m'a apporté tout au long de ma maîtrise. Également, je remercie le Dr Timothy L. Reudelhuber de m'avoir permis d'utiliser ses constructions et de les modifier pour les fins de mon projet. J'aimerais faire un grand remerciement au Dr David Rhainds qui a été avant tout un ami, une grande ressource intellectuelle et un collègue fort important dans ce projet. Je voudrais aussi grandement remercier une femme admirable, Suzanne Benjannet, qui a été d'un grand support et une ressource intellectuelle incontestable, sans oublier Éric Bergeron qui fut un collègue remarquable et dont l'opinion intellectuelle et technique dans mon cheminement fut fort importante. Je remercie Josée Hamelin qui m'a été d'une grande aide technique ainsi qu'à Nasha Nassoury qui a été ma voisine de travail ainsi que ma collègue en microscopie. Je tiens aussi à remercier Ann Chamberland et Marie-Claude Asselin pour leur support technique et leur compagnie ainsi que tous les autres étudiants et personnel technique. Je n'oublie pas non plus mon ami Philippe Martel pour son support moral et son expertise en la matière ainsi que ma famille et mes amis qui ont toujours été présents pour moi. Merci à vous tous qui m'ont appuyé.

INTRODUCTION

Chapitre I : Introduction

1.1 La voie sécrétoire.

La synthèse des protéines commence par un transcrit d'ARNm qui est traduit par les ribosomes au niveau du cytosol. La fonction de la protéine déterminera si sa traduction s'achèvera dans le cytosol ou si elle se poursuivra dans le réticulum endoplasmique (RE). Toutes les protéines traduites au niveau du RE s'engagent dans la voie sécrétoire. Le RE est un compartiment intracellulaire séparé du cytosol par un réseau de membranes. Il existe plusieurs types de protéines qui sont synthétisées dans le RE. Citons en exemple les hormones, les récepteurs et les enzymes. Le RE est aussi le lieu de synthèse de plusieurs lipides composant les membranes cellulaires. Le pH du RE est de 7,4 et la concentration en ion calcium $[Ca^{2+}]$ est de 1mM (1). Cette concentration élevée en calcium est primordiale pour l'activation et le repliement de certaines protéines. La traduction d'une protéine sécrétoire débute souvent par le peptide signal (PS). Cette séquence, sera reconnue par un complexe protéine/ARN dénommé particule de reconnaissance du signal (PRS) situé au niveau du cytosol. La PRS cycle entre le RE et le cytosol afin de détecter les protéines destinées à la voie sécrétoire, qui une fois reconnues, mène à la liaison de la PRS au ribosome. Ceci provoque une pause de la traduction. Ce complexe sera par la suite reconnu et fixé par le récepteur de la PRS (RPRS), situé dans la membrane du RE. Cette fixation permet au RPRS de diriger le complexe vers le translocateur. Au niveau de ce dernier, la PRS et son récepteur relâchent le complexe ribosome-protéine, permettant l'attachement du ribosome sur le translocateur et la poursuite de la traduction. Le translocateur, composé du complexe Sec61, fait office de canal pour le passage des polypeptides à l'intérieur du RE. L'interaction du ribosome avec ce canal, provoque son ouverture, permettant ainsi la translocation de la chaîne naissante dans le RE. Une peptidase du RE clive le PS durant la synthèse (2). Les premières modifications post-traductionnelles débutent dans le RE. La glycosylation des résidus asparagine (N) ainsi que la formation des ponts disulfures entre deux résidus cystéine (C) contribuent au bon repliement de la protéine. Plusieurs

protéines chaperonnes telles que BiP, calnexine ou calréticuline contribuent au bon repliement protéique.

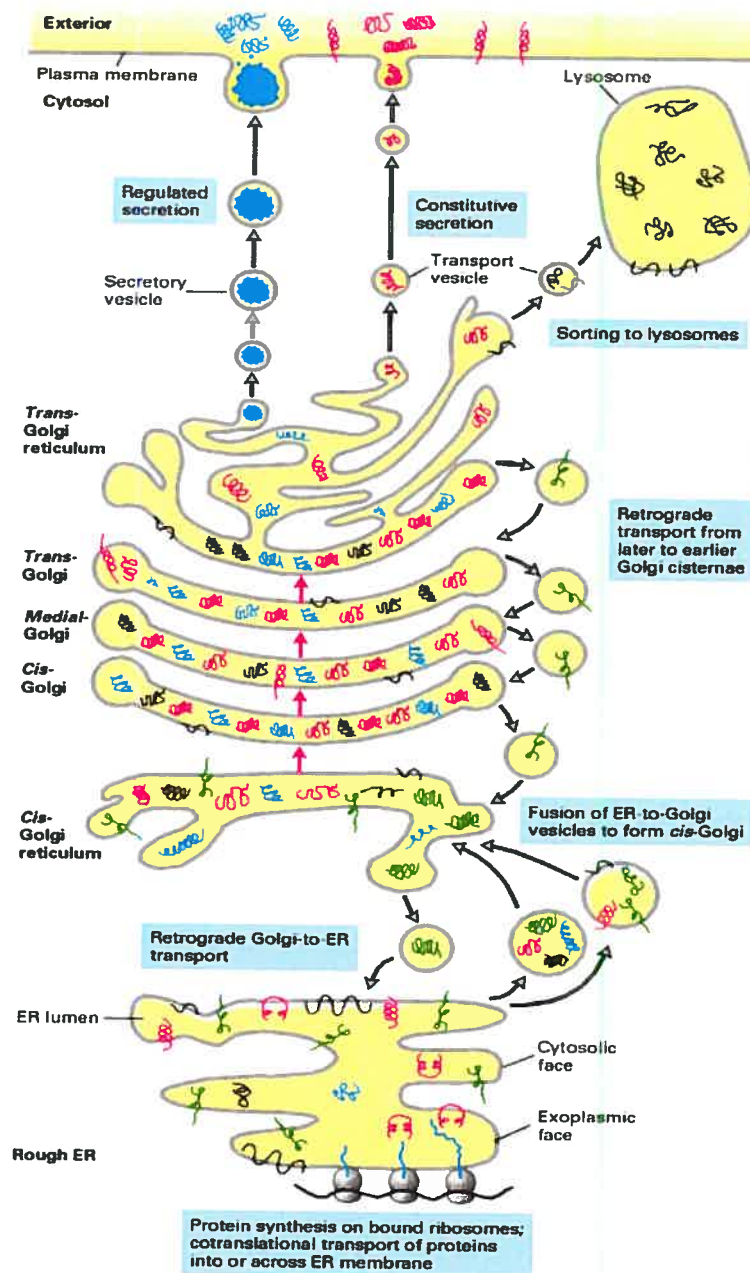


Figure 1 : La voie sécrétoire cellulaire

Les transcrits d'ARNm des protéines destinées à la voie sécrétoire seront traduits dans le RE où leur PS seront enlevés. Par la suite, ces protéines se dirigeront dans l'appareil de Golgi où elles subiront plusieurs étapes de maturation afin d'y être sécrétées par les vésicules de sécrétion émergeant du TGN. (Tirée de *Molecular Cell Biology*, 4th ed Figure 17-13 (81))

Tant et aussi longtemps que la protéine n'a pas la bonne conformation, les chaperonnes la séquestreront dans le RE. L'exposition de résidus hydrophobes à la surface de la protéine est un signe de mauvais repliement protéique. BiP ou les autres chaperonnes, interviennent dans ce cas, en masquant ces résidus en les repositionnant dans le cœur hydrophobe de la protéine. Ceci empêche l'agrégation des protéines dans le RE. Certaines protéines nécessitent une N-glycosylation pour leur bon repliement. Ainsi, un mauvais repliement de celles-ci fait intervenir la calnexine ou la calréticuline. Ces dernières reconnaissent les oligosaccharides monoglucosylés et préviennent l'agrégation de ces protéines dans le RE. Les ponts disulfures, entre deux cystéines, sont générés grâce aux oxydoréductases comme l'isomérase des ponts disulfures (3). Le RE est aussi le lieu où se déroule l'hydroxylation des prolines, des lysines et l'ancrage aux membranes lipidiques par l'ajout d'une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) à l'extrémité C-terminale de certaines protéines membranaires destinées à la membrane plasmique. Cette liaison se forme dans la lumière du RE, où, au même moment, le segment transmembranaire de la protéine est coupé (1) (**Figure 1**).

Dans le cas où le repliement, induit par ces chaperonnes est inefficace, les protéines seront rétrogradées vers le cytosol où elles seront dégradées par le protéasome. Ce processus de dégradation se nomme *endoplasmic reticulum associated degradation* (ERAD). Ceci s'explique par le fait qu'un long séjour dans le RE expose ces protéines à l'action de la mannosidase I. Celle-ci a pour rôle de retirer un résidu mannose de leur(s) chaîne(s) d'oligosaccharides pour ainsi permettre leur reconnaissance par la protéine EDEM (*ER degradation-enhancing 1,2-mannosidase-like protein*), une nouvelle lectine, qui les ciblera par la suite vers le complexe Sec61 afin qu'elles soient rejetées dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, ces protéines aberrantes subiront l'action des enzymes E1 E2 et E3 qui les ubiquitineront afin qu'elles soient dégradées par le protéasome (3, 4).

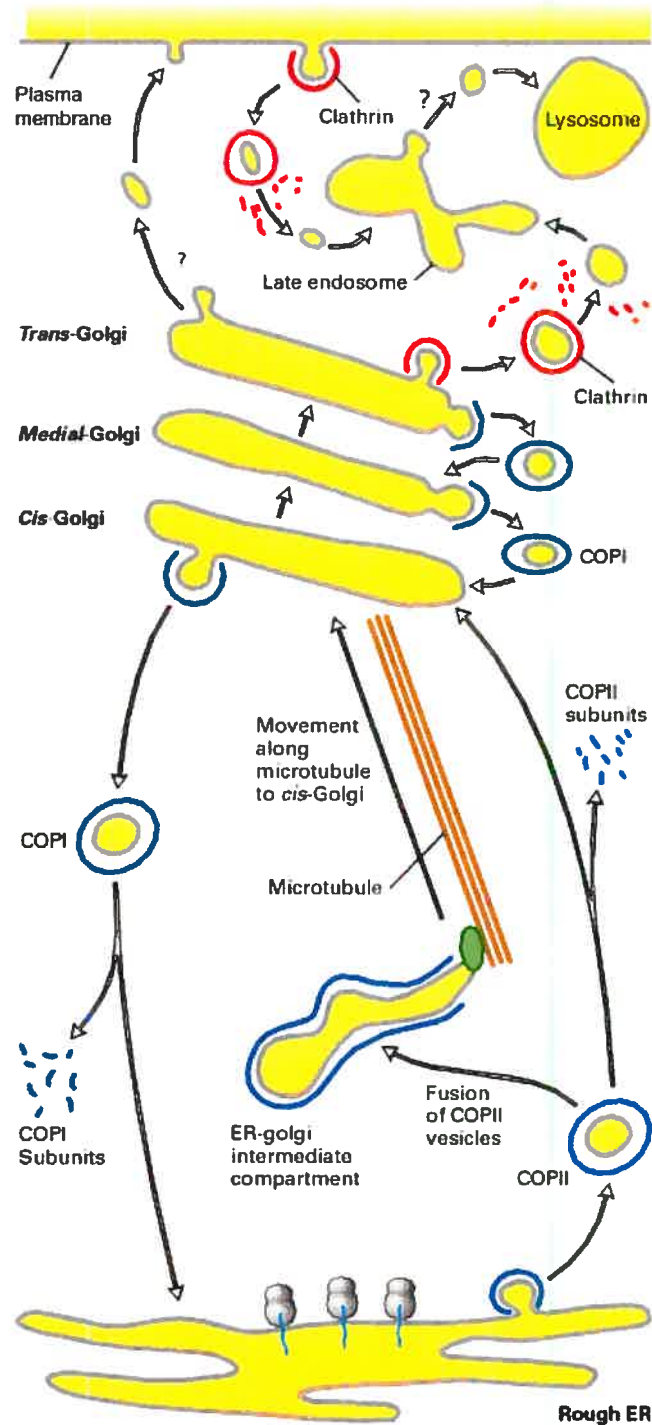


Figure 2 : Les protéines d'enrobage vésiculaire dans la voie sécrétoire et d'endocytose

Les protéines de la voie sécrétoire voyagent dans des vésicules. Les vésicules partant du RE vers le RCG sont recouvertes de COPII (transport antérograde). Le transport rétrograde soit du RCG vers le RE et du *médial-Golgi* vers le *cis-Golgi* se fait par les vésicules recouvertes de COP I. (Tirée de **Molecular Cell Biology**. 4th ed Figure 17-50 (80))

Tout au long de la voie sécrétoire, les protéines ainsi synthétisées voyagent par l'intermédiaire de vésicules. Les vésicules sont en fait des bourgeonnements des membranes du compartiment de départ. Ainsi, se crée un trafic vésiculaire rétrograde et antérograde entre les organelles de la voie sécrétoire. Du RE, les protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi. Le Golgi est le second organelle de la voie sécrétoire après le RE. Il est composé de plusieurs compartiments, appelés citernes, isolés du cytosol par une bicouche lipidique. Le Golgi est le lieu de maturation et de triage des protéines. Les citernes faisant face au RE forment le réseau *cis*-Golgien (RCG). C'est la voie d'entrée du Golgi. La voie de sortie correspond au réseau *trans*-Golgien (RTG). Le RTG est l'endroit de triage des protéines matures ou celles destinées aux lysosomes. Le pH du Golgi est légèrement plus acide que celui du RE, soit de 6,4 et la $[Ca^{2+}]$ est supérieure, soit de 3 mM (1). Les vésicules partant du RE vers le RCG sont recouvertes d'un complexe protéique nommé COP II (*coat protein complex II*). Celui-ci a pour rôle de bourgeonner la membrane du RE en une vésicule contenant le cargo protéique. Le bourgeonnement se fait à partir de régions spécifiques du RE appelées *sites de sortie du RE*. Ceci constitue le transport antérograde. Le transport rétrograde soit du RCG vers le RE et du *médial*-Golgi vers le *cis*-Golgi se fait de la même façon, mais par les vésicules recouvertes de COP I (*coat protein complex I*). Le but du transport rétrograde est de renvoyer les protéines destinées au RE. On n'a qu'à penser aux chaperonnes comme BiP. Ces protéines résidentes du RE ont à leur extrémité C-terminale un motif KDEL qui assure leur reconnaissance et leur liaison aux récepteurs des KDEL dans les vésicules de retour (5, 6). Les protéines mal repliées sont aussi retournées au RE. C'est le cas de l'IgE, qui par son motif di-lysine dans sa partie cytosolique, s'associe au complexe COP I lorsque la protéine adopte une mauvaise conformation (7) (**Figure 2**).

Les mécanismes de transport entre les citernes golgiennes ne sont pas aussi bien définis que ceux entre le RE et le RCG. Deux modèles de transport ont été élaborés suite aux observations faites en microscopie. Le premier appelé **le modèle de transport vésiculaire** est le plus connu. Dans ce modèle, l'appareil de Golgi est un compartiment qui est figé dans le cytoplasme. Le transport se fait par l'intermédiaire de vésicules se dirigeant du *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi. Les vésicules enrobées de COP II, provenant

du bourgeonnement des citernes, déversent ainsi leur contenu protéique dans les citernes suivantes pour la prochaine étape de maturation. Le second modèle, appelé **le modèle de maturation sacculaire**, nous présente un appareil de Golgi qui est plutôt dynamique. Les vésicules en partance du RE se fusionnent pour constituer le RCG. Ce compartiment, migrant vers la membrane plasmique, se mature de plus en plus dû au transport rétrograde des vésicules recouvertes de COP I. Ces vésicules apportent les enzymes nécessaires à la maturation des protéines dans ce compartiment. Une fois leur travail achevé, ces enzymes sont rétrogradées vers les citernes antérieures pour un autre cycle de maturation. Ainsi, le RCG devient le RTG en fin de migration. Ce modèle a l'avantage d'expliquer comment certaines structures aussi imposantes que les écailles de certaines algues (étant trop grosses pour se déplacer dans des vésicules de transport classiques) parviennent à être sécrétées (1, 8).

Comme mentionné auparavant, l'appareil de Golgi est le lieu de maturation des protéines. Par exemple, certaines protéines N-glycosylées (N=Asparagine) dans le RE perdent plusieurs résidus mannoses et gagnent d'autres types de saccharides comme le N-acétylglucosamine, le galactose, le fucose et l'acide sialique. Ensuite, certaines sérines et thréonine sont glycosylées dans le Golgi. D'autres modifications post-traductionnelles ont lieu dans le Golgi, comme la sulfatation des tyrosines ou de l'acide sialique, la phosphorylation, l'amidation, l'acétylation et la formation de pyroglutamines (1). Les protéines mal repliées qui ont échappé au contrôle de qualité du RE sont ciblées vers les lysosomes pour y être dégradées. Donc, même le Golgi peut jouer un rôle dans le contrôle de qualité (4). Certaines protéines précurseurs ont besoin de subir une endoprotéolyse pour être activées. Dans certain cas, c'est leur prosegment qui est clivé afin de libérer la molécule active. Le préfixe Pro indique un précurseur de la protéine active. Il y a deux types de prosegments. Le type I catalyse le bon repliement de la protéine en abaissant l'énergie d'activation nécessaire au repliement. Le type II assure en plus le ciblage intracellulaire (9). Le clivage de plusieurs précurseurs sécrétoires se fait par l'intermédiaire d'une famille de sérine protéases nommées les proprotéines convertases (PCs) (10). Nous traiterons davantage de ces protéases un peu plus loin.

Des vésicules de sécrétion bourgeonneront du RTG afin de distribuer ces protéines matures vers les compartiments cellulaires appropriés, vers la surface cellulaire à la membrane plasmique et dans le milieu extracellulaire. Quant aux lysosomes, ceux-ci recevront des vésicules contenant entre autre des enzymes servant à la dégradation protéique ainsi que des protéines à dégrader. Il existe deux voies de sécrétion, la voie de sécrétion constitutive et la voie de sécrétion régulée. La voie constitutive est présente dans toutes les cellules. Les vésicules de sécrétion partantes du RTG se fusionnent à la membrane plasmique pour y déverser leur contenu dans le milieu extracellulaire. Les protéines ainsi sécrétées sont dirigées dans cette voie car elles n'ont pas de motif de ciblage. Il s'agit de la voie par défaut. Toutefois elles peuvent être recaptées par les cellules pour les diriger vers un compartiment comme les lysosomes. C'est le cas des protéines marquées au mannose-6 phosphate (M6P) qui utilisent la voie externe. Certaines cellules, telles que les cellules endocrines ont une deuxième voie de sécrétion, la voie de sécrétion régulée. Dans ce cas, les grosses vésicules sortant du RTG sont emmagasinées dans le cytoplasme. On les appelle granules de sécrétion immature. La maturation de ces granules commence par une baisse du pH à 5,5 et se poursuit par une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ à 10 mM. La sécrétion ne se fera que lorsqu'un stimulus précis excite la cellule. Par exemple, un potentiel d'action (stimulus électrique) dans le neurone provoque une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ dans le cytosol provoquant ainsi le déversement du contenu de ces granules dans la synapse. De plus, les protéines contenues dans ces granules doivent avoir un motif ou une structure particulière les dirigeant vers ces granules; privées de ce motif elles sont sécrétées constitutivement. Le motif dirigeant ces protéines dans ces granules est encore inconnu (1).

Les protéines sécrétées ne restent pas en fonction éternellement. En réalité, il se crée un équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation de celles-ci. La dégradation protéique permet à la cellule de recycler ses composantes. En effet, les acides aminés de la dégradation protéique deviennent la source pour la synthèse des nouvelles protéines. Deux voies de dégradation se présentent à nous. Il y a la voie lysosomale et la voie d'ubiquitine-protéasome. La voie lysosomale permet la dégradation des protéines extracellulaire par un processus d'endocytose. Elle permet

aussi la dégradation de vieilles organelles (l'autophagie), ainsi que la dégradation d'organismes étrangers par la phagocytose (1). Cette voie a aussi démontré son utilité dans le contrôle de la qualité lors de la dégradation de protéines mal repliées retrouvées dans le Golgi et dans la dégradation de protéines membranaires comme les récepteurs (4, 11).

Le lysosome est un compartiment entouré d'une bicouche lipidique et rempli d'enzymes d'hydrolyse servant à la digestion, intracellulaire contrôlée, des macromolécules. Ce compartiment contient environ 40 types d'enzymes hydrolytiques, dont des protéases, des nucléases, des glycosidases, des lipases, des phospholipases et des sulfatases. Ces enzymes sont toutes des hydrolases acides. Par endocytose du liquide extracellulaire, les molécules endocytées voyagent dans des vésicules vers les endosomes précoces. Certaines molécules endocytées seront sélectivement recapturées et recyclées vers la membrane plasmique. Le restant, arrivant aux endosomes tardifs, confronteront pour la première fois les hydrolases lysosomales. A ce stade, le pH est d'environ 6. Le processus de maturation des endosomes tardif en lysosomes se fait par une baisse graduelle du pH du contenu. Ceci est possible grâce à une pompe à proton (H^+) dépendante de l'ATP qui achemine les protons cytoplasmiques vers le contenu endosomal. Ce processus est nécessaire au bon fonctionnement des enzymes hydrolytiques nécessitant un pH acide. La maturation du compartiment endosomal en lysosome est fonction de la baisse du pH. Au stade de lysosome, le pH est de 5,5.

Les hydrolases acides destinées aux lysosomes sont reconnues dans la voie sécrétoire par leur marquage au mannose 6-phosphate (M6P). Ce marqueur est reconnu à son tour par le récepteur protéique membranaire du M6P qui se trouve dans le RTG. Le récepteur fixe spécifiquement les hydrolases lysosomales, les accumule dans des vésicules recouvertes de clathrine à un pH compris entre 6,5 et 6,7 dans le RTG et les achemine dans les endosomes tardif, à pH 6. De ce fait, les hydrolases se dissocient du récepteur. La diminution progressive du pH, dû à la maturation endosomale, active par la suite les hydrolases pour ainsi commencer la digestion. Le récepteur est finalement renvoyé à la membrane du RTG pour refaire un autre cycle. Le marquage au M6P d'une enzyme lysosomale se fait par la reconnaissance spécifique d'une séquence consensus

d'acides aminés situé à la surface protéique de celle-ci qu'on appelle le *patch de signal*. Deux enzymes travaillent séquentiellement pour catalyser l'ajout des groupements M6P sur les hydrolases acides. La première est la GlcNAc-phosphotransférase qui lie spécifiquement l'hydrolase, par sa séquence consensus (*patch de signal*) et ajoute un GlcNAc-phosphate sur un ou deux résidus mannoses de chaque chaîne oligosaccharidique. La deuxième enzyme coupe alors les résidus GlcNAc, exposant ainsi le M6P (1).

Un des rôles le plus connu de la voie lysosomale, et ayant son importance dans notre cas est son implication dans la dégradation des LDLs (lipoprotéines de basse densité) par l'intermédiaire du récepteur des LDLs (LDL-R). Les LDLs sont issues des IDL (lipoprotéines de densité intermédiaire) et constituent la dernière classe de lipoprotéines de la cascade des lipoprotéines contenant l'apoB-100. Par l'action des lipases, la particule de VLDL (lipoprotéines de très faible densité) originale, dans sa course vers la classe des LDLs, perd la majeure partie de ses TG (triglycérides) et s'enrichit en EC (ester de cholestérol). Les LDLs sont composées d'environ 6% de TG 42% d'EC, 8% de CL (cholestérol libre), 22% de PL (phospholipides) et 22% de protéines. Une seule copie de l'apoB-100 est présente dans une LDL et elle est nécessaire au maintien de l'intégrité structurelle de la particule

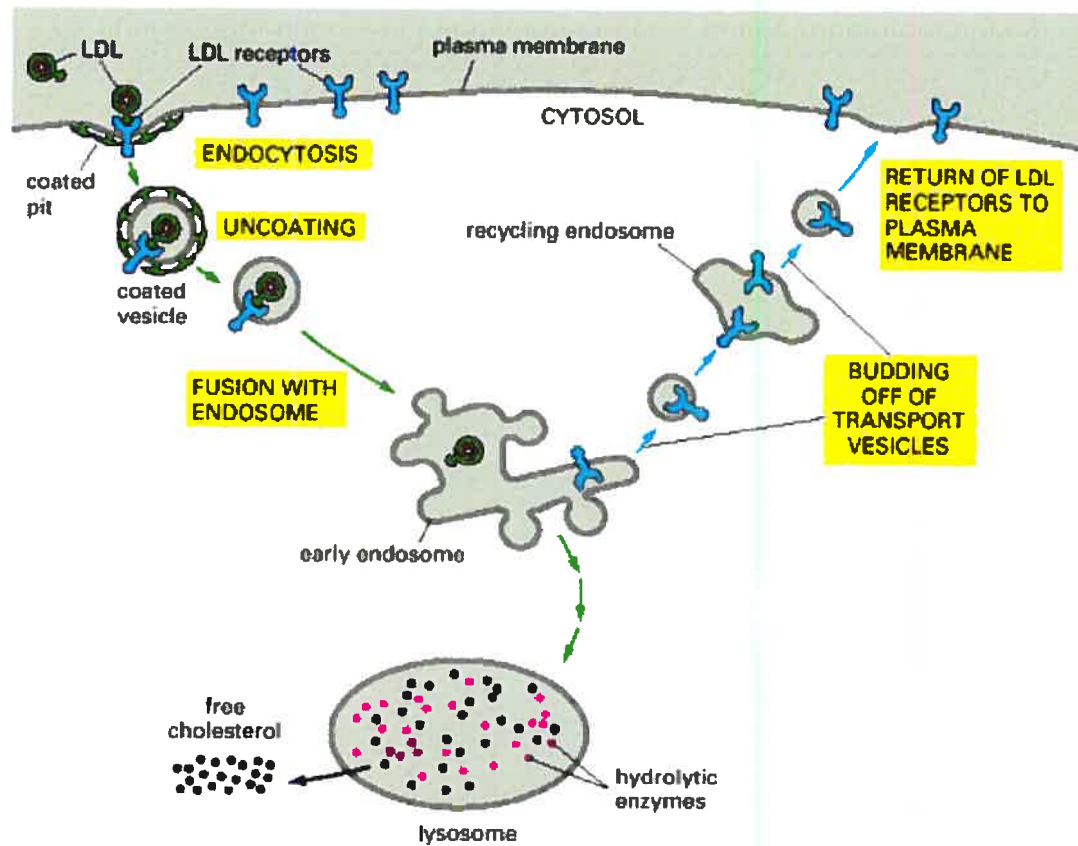


Figure 3 : L'endocytose des LDL et le recyclage du LDLR

Une LDL circulante sera captée par le LDL-R. Ce complexe sera par la suite internalisé dans une vésicule recouverte de clathrine, vers les endosomes précoces. A ce stade, la LDL se détache du LDL-R dû à l'acidité des endosomes précoces. Ce détachement permet ainsi le recyclage du LDL-R à la surface cellulaire. Les LDL restantes seront par la suite dégradées dans les lysosomes où leur contenu en cholestérol sera libéré dans le cytosol. (Tirée de **Molecular Biology of the Cell** 4th ed Figure 13-46 (1))

Le LDL-R est un récepteur transmembranaire qui capte les LDLs circulant dans le sang. Ce récepteur est par la suite internalisé avec le LDL dans une vésicule recouverte de clathrine cheminant vers les endosomes précoces. A ce point, les LDLs se détachent de leurs récepteurs, dus au pH acide des endosomes. Les LDL-Rs sont ensuite recyclés à la surface cellulaire. La LDL emmagasinée dans les endosomes est dégradée durant la maturation lysosomale. Enfin, le cholestérol obtenu après la dégradation des LDLs est expulsé dans le cytoplasme (**Figure 3**). Plusieurs protéines membranaires comme le récepteur de l'EGF (EGF-R) (*epidermal growth factor receptor*) sont dégradées dans la voie lysosomale en utilisant un signal donné par la monoubiquitine. Par exemple, l'EGF-R est endocyté quand il se lie à son ligand. Cette liaison recrute une ubiquitine ligase cytosolique, comme c-Cbl, qui le monoubiquitine sur une lysine de sa queue cytoplasmique. Ceci entraîne l'internalisation du récepteur dans une vésicule se dirigeant vers les endosomes précoces. Il s'ensuit une séquestration de ces récepteurs dans ces endosomes par la formation de petites vésicules. Celles-ci forment les corps multivésiculaires des endosomes tardifs. Au stade du lysosome, les protéases lysosomales se chargeront de la dégradation (11).

Le processus d'ubiquitination est extrêmement important pour la survie cellulaire. D'ailleurs, les découvertes faites sur l'ubiquitination furent récompensées en 2004 pour le prix Nobel de chimie décerné à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose pour leurs travaux sur le rôle de l'ubiquitine dans les systèmes de dégradation des protéines (12). L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés, extrêmement conservée de la levure jusqu'à l'homme. Son rôle principal consiste à marquer une protéine pour la dégradation par le protéasome 26S. Dans ce cas, le signal de dégradation est une polyubiquitination. Le processus d'ubiquitination est entrepris par trois enzymes, dont la plupart sont cytosoliques, nommés E1, E2, et E3. L'enzyme E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine), dépendante de l'ATP, prépare l'ubiquitine pour sa liaison aux autres protéines en créant une ubiquitine active qui sera par la suite transférée aux enzymes de type E2 (enzyme de liaison de l'ubiquitine). Les E2 s'associent avec des protéines accessoires E3. Cette association crée un complexe appelé enzyme de liaison de l'ubiquitine. La partie E3 se lie à la protéine destinée à la dégradation en reconnaissant les signaux de dégradation. La liaison permet ainsi à

l'enzyme E2 de fixer l'ubiquitine sur le groupement ϵ -aminé de la chaîne latérale d'une lysine (K). Le prochain cycle d'ubiquitination fixe la prochaine ubiquitine sur la lysine 48 (K48) de l'ubiquitine précédente pour ainsi créer une chaîne de polyubiquitines sur la protéine à dégrader (13) (**Figure 4**). Une des principales fonctions de cette voie protéolytique est non seulement de reconnaître et d'éliminer les protéines mal repliées ou anormales, mais elle permet aussi de conférer une courte demi-vie à certaines protéines dont la concentration doit rapidement varier selon l'état de la cellule. Certaines protéines, à courte durée de vie, sont continuellement dégradées alors que plusieurs autres ont une demi-vie conditionnelle, voulant dire qu'elles sont stables à certaines conditions, mais deviennent instables lorsque l'état cellulaire change. Par exemple, tout au long du cycle cellulaire, les cyclines mitotiques ont une longue durée de vie, quand arrive soudainement leur dégradation à la fin de la mitose par le complexe promoteur de l'anaphase (APC). L'APC est une ubiquitine-protéine ligase, à plusieurs sous-unités, activée par l'addition de Cdc20 lors de la mitose. L'APC activée provoque alors la dégradation des cyclines mitotiques et de plusieurs autres régulateurs de la transition métaphase-anaphase. Les substrats polyubiquitinés par l'APC ont une séquence de neuf acides aminés (RxxLxxIxN), suivie par un domaine riche en lysine qui a été défini comme la boîte de destruction des cyclines (14). Les protéines destinées à être dégradées affichent un signal de dégradation. Par exemple, la présence de séquences spécifiques, comme les boîtes de destruction des cyclines. Les acides aminés en N-terminal (la règle du N-terminal), engendrés suite à un clivage en N-terminal, peuvent être reconnus par une E3 spécifique comme étant un résidu déstabilisant. Comme résidu, nous parlons de l'Arg, Lys, His, Phe, Leu, Tyr, Trp, Ile, Asp, Glu, Asn et Gln. Le démasquage d'un signal de dégradation, par la dissociation régulée d'une sous-unité protéique, signale aussi une protéine pour la dégradation (1). Les protéines avec des acides aminés basiques dans leur N-terminal sont moins stables. De plus, les vieilles protéines peuvent exposer des résidus hydrophobes dû à la dénaturation. Mais le signe le plus important est le marquage post-traductionnel comme la phosphorylation d'un site spécifique qui démasque un signal de dégradation normalement enfoui dans la protéine (15).

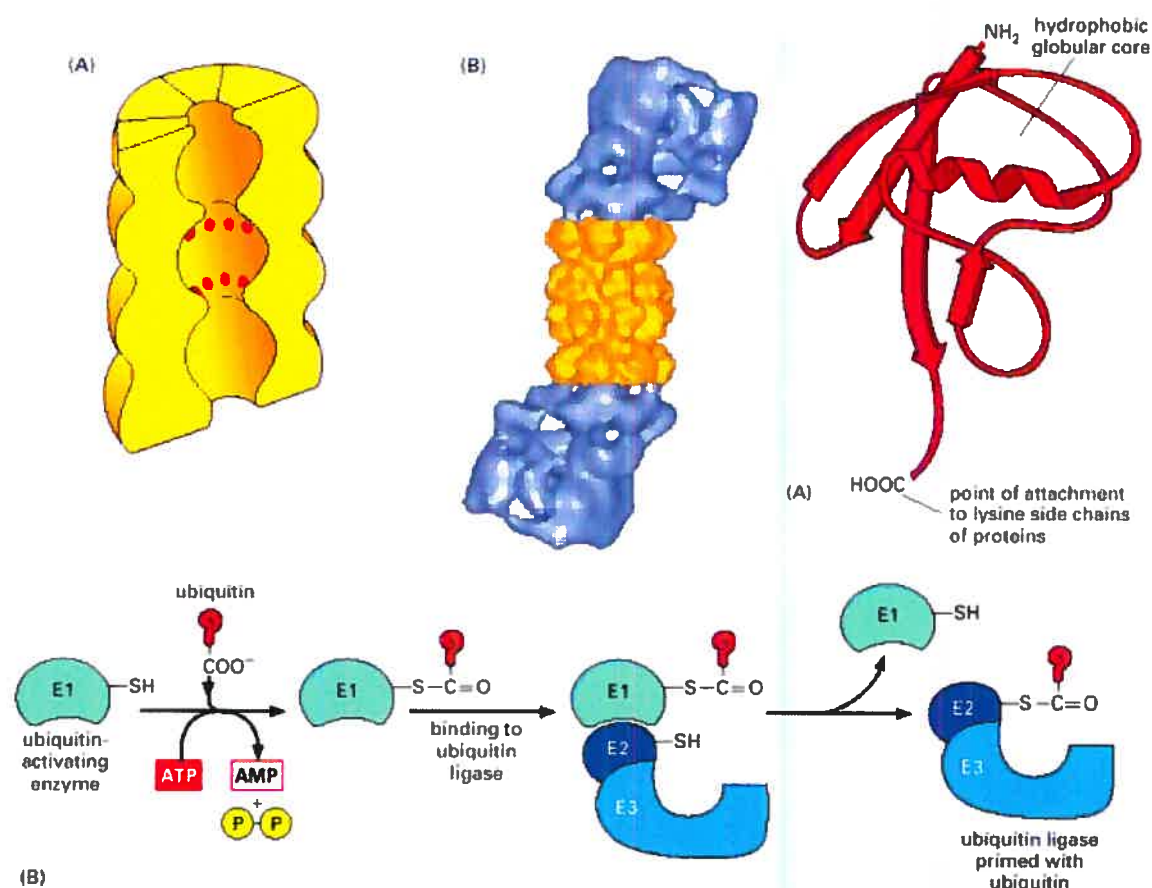


Figure 4 : L'ubiquitination et le protéasome

Voici la structure tridimensionnelle de l'ubiquitine et du protéasome servant à la dégradation des protéines. Le processus d'ubiquitination est entrepris par trois enzymes cytosoliques, qu'on nomme E1, E2, et E3. L'enzyme E1 active l'ubiquitine à l'aide de l'ATP et la transmet à l'enzyme E2. Cette dernière avec l'enzyme E3 reconnaissent les protéines à dégrader et les ubiquitines. Un autre cycle se refait pour polyubiquitiner la protéine à dégrader. La prochaine ubiquitine sera rajoutée sur la lysine 48 de l'ubiquitine précédente pour ainsi faire une chaîne de polyubiquitine. (Tirée de **Molecular Biology of the Cell** 4th ed Figures 6-86 et 6-87 (1))

Une fois ubiquitinées, ces protéines sont dégradées dans le protéasome 26S. Le protéasome peut être comparé à un broyeur dû à sa forme cylindrique composée d'unités heptamériques. Il est composé de deux parties, soit les unités régulatrices 19S et les unités catalytiques 20S. Une fois assemblés, ils forment un protéasome de 26S. Les unités catalytiques sont assemblées en deux unités β en sandwich entre deux unités

α . Ces unités sont en fait des protéases dont le site actif est exposé à l'intérieur du cylindre. Les unités régulatrices sont de part et d'autre des unités α et sont composées d'une base et d'un couvercle permettant l'entrée des protéines et la sortie des peptides. Les unités régulatrices sont composées d'ATPases qui déplient les protéines afin qu'elles puissent entrer dans le protéasome. Le protéasome coupe plusieurs fois les chaînes polypeptidiques afin d'obtenir en bout de ligne de courts peptides de huit acides aminés

1.2 Les Proprotéines Convertases (PCs)

Comme mentionné auparavant, les PCs de la voie sécrétoire sont impliquées dans l'activation de plusieurs précurseurs protéiques. La découverte des PCs a débuté par la découverte du gène de Kex2 (*killer expression 2*) dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire de 812 acides aminés. Celle-ci a la capacité de cliver à des sites de paires d'acides aminés basiques (Lys-Arg et/ou Arg-Arg) dans des précurseurs protéiques (16). Ces coupures se font à l'aide d'une triade catalytique composée de l'acide aspartique (D), de l'histidine (H) et d'une serine (S) (17, 18). Cette observation a permis la découverte d'un gène homologue au gène Kex2 chez les mammifères soit le gène *fur* qui a environ 50 % de similitude de séquence. Le gène *fur* code pour une PC transmembranaire nommée Furine. Comme Kex2, la Furine coupe à des paires d'acides aminés basiques. L'identification et la caractérisation du gène *fur* a permis la découverte d'autres membres de la famille des PCs. PC1 et PC2 sont responsables chez les mammifères de la coupure du précurseur de la POMC (proopiomélanocortine) à différents sites de paire d'acides aminés basiques permettant ainsi la libération de plusieurs hormones biologiquement actives. Dans la partie antérieure de l'hypophyse, PC1 coupe la POMC pour donner l'ACTH (*adrenocorticotropin hormone*) et la β -LPH (β -*lipotropin hormone*). Dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse, PC2 fonctionne séquentiellement par rapport à PC1 en clivant la POMC et libérant la α -MSH (*melanocyte-stimulating hormone*) et la β -END (β -*endorphin hormone*) (19). Il y a neuf membres de la famille des PCs faisant partie de la famille des subtilases. Sept d'entre eux font partie de la

sous-famille des *subtilisin/kexine like* soit la Furine, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 et PC7 qui clivent à des sites monobasiques ou des paires d'acides aminés basiques. Notons que PC5 a deux isoformes soit PC5A et PC5B. SKI1/S1P (*subtilisin-kexin isozyme-1*) le huitième membre, fait plutôt partie de la sous-famille de la *pyrolysine* possédant un motif de reconnaissance hydrophobique. (Figure 5). Enfin, le neuvième membre, PCSK9 fait plutôt partie de la famille de la *protéinase K*. SKI-1/S1P et PCSK9 jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol. Le lieu d'action des PCs se fait dans la voie sécrétoire.

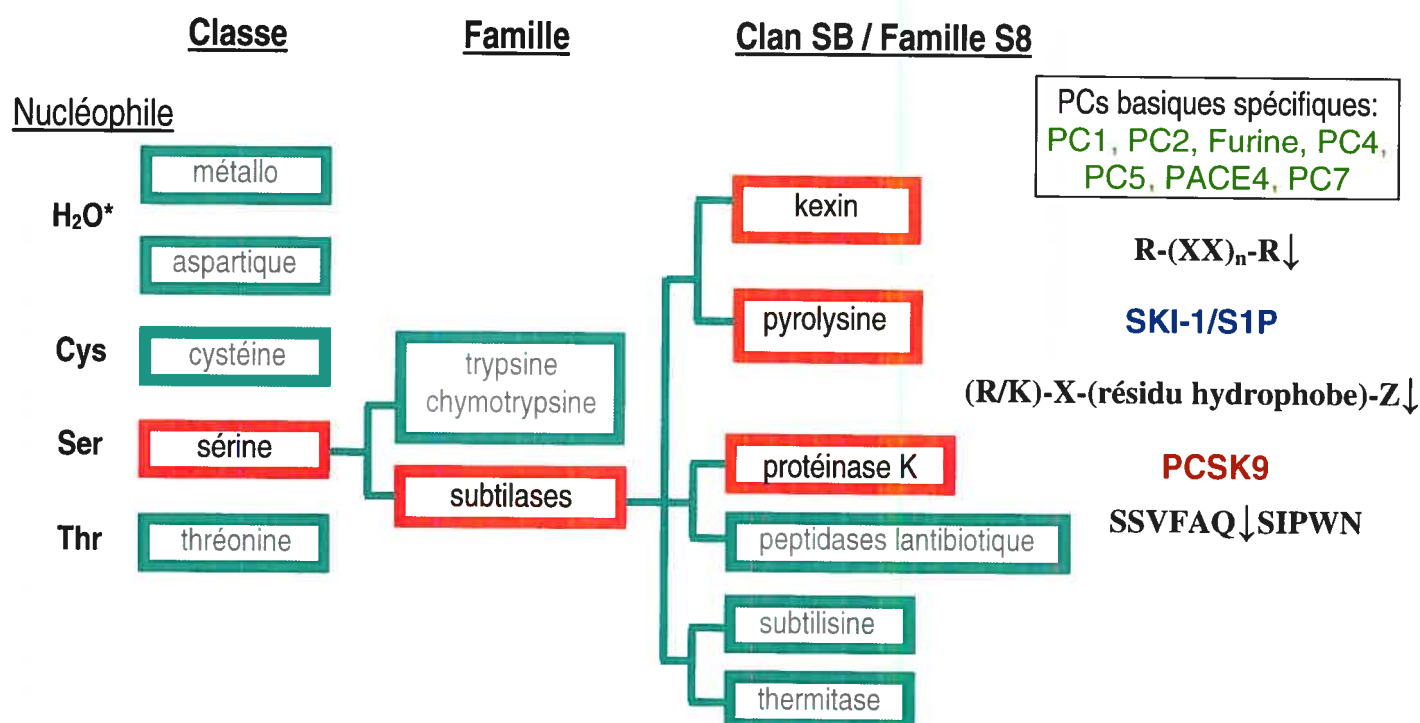


Figure 5: Arbre phylogénique des proprotéines convertases basé sur l'alignement des domaines catalytiques

La Furine, PC4, PACE4, PC5A et PC7 agissent au niveau du RTG, de la surface cellulaire et dans les endosomes. PC1/3 et PC2 se retrouvent au niveau des granules de sécrétion à corps denses et PC5B dans les compartiments pré-RTG. Quant à SKI-1/SIP, on le retrouve dans le Golgi et PCSK9 est sécrétée et ré-internalisée dans les endosomes à partir de la surface cellulaire (20). (**Figure 6**).

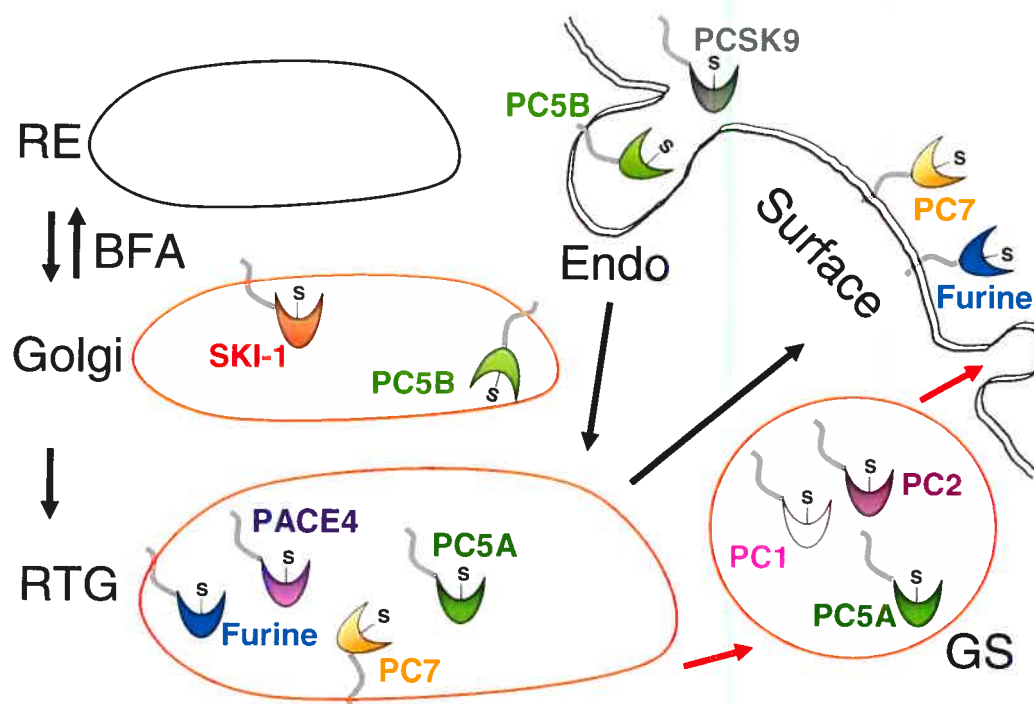


Figure 6: Localisation cellulaire des proprotéines convertases.

RE : réticulum endoplasmique; BFA : Brefeldin A; RTG : réseau trans-golgien; Endo : endosomes; GS : granules de sécrétion.

Les PCs sont composés de quatre domaines fonctionnels, soit la prorégion ou le prosegment, le domaine catalytique, le domaine P et le domaine C-terminal (21) (**Figure 7**).

Famille des Proprotéines Convertases

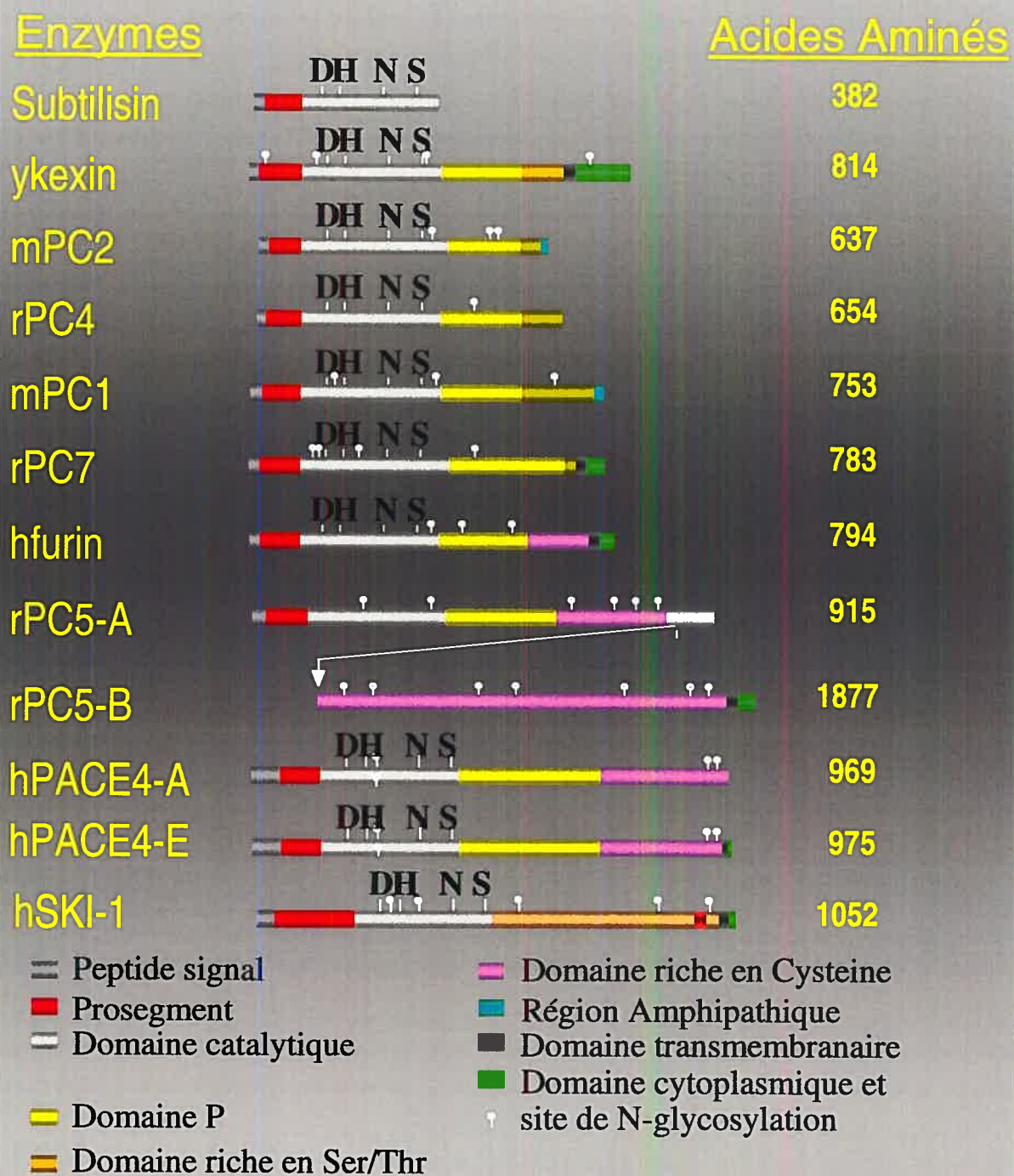


Figure 7: Représentation schématique des PC et de leurs homologues

Le prosegment : Le prosegment est un polypeptide de 80 à 90 acides aminés qui joue le rôle de chaperonne intramoléculaire et d'inhibiteur compétitif (21). Ce prosegment de type I a la caractéristique de faciliter le repliement enzymatique en abaissant l'énergie d'activation nécessaire au processus (9). Lors de la synthèse d'une PC dans le RE, le prosegment demeure étroitement lié au domaine catalytique de la PC, empêchant ainsi son activation précoce. La PC se libère de son prosegment et s'active lorsqu'elle atteint le bon compartiment cellulaire. Pour mieux comprendre le fonctionnement du prosegment et le mécanisme d'autoactivation général des PCs, nous décrirons le cas de la Furine comme modèle. En premier lieu, il faut comprendre que l'activation des PCs se fait en plusieurs étapes requérant son autocatalyse. La spécificité de clivage d'une PC lui permet de cliver son tout premier substrat, soit son propre prosegment. Une fois la synthèse terminée dans le RE, la Furine exécute le premier clivage de son prosegment au site consensus R-T-K-R¹⁰⁷↓ à pH neutre. Cette étape déterminante s'exécute rapidement avec une demi-vie de dix minutes. Le prosegment demeure attaché au site catalytique inhibant ainsi l'enzyme. Cette première coupure effectuée permet à la Furine de passer le contrôle de la qualité du RE et d'être transportée vers le RTG. Arrivée à destination, la Furine coupe une deuxième fois son prosegment, cette fois au site -R-G-V-T-K-R⁷⁵↓. Ce clivage se fait plus lentement avec un demi-temps supérieur à deux heures. Cette deuxième coupure élimine l'interaction du prosegment avec le site catalytique. De plus, lors du transport de la Furine avec son prosegment dans la voie sécrétoire, on remarque que les changements environnementaux telle l'augmentation du [Ca²⁺] et la baisse du pH font en sorte que le prosegment se détache progressivement du site catalytique permettant l'activation de la Furine (22). PC2 fait exception quant à ce modèle d'autoactivation des PCs. En effet, la première coupure du prosegment de PC2 se fait plus tardivement dans la voie sécrétoire, soit dans les granules de sécrétion (23). En plus, PC2 a besoin de 7B2 pour être clivé. 7B2 est une granine de 186 acides aminés ayant un rôle de chaperonne moléculaire et d'inhibiteur de PC2. Au niveau du RE, 7B2 est attaché à proPC2 et la maintient inactive. Quand ce complexe est transporté vers le RTG, 7B2 est premièrement coupé par la Furine ou PACE4 permettant ainsi la libération de la partie N-terminale de 7B2. Quant à la partie C-terminale de ce dernier, celle-ci demeure attachée à l'enzyme. Dans les granules de sécrétion, la partie C-terminale de 7B2 est coupée une deuxième fois, mais cette fois par PC2. Ceci libère

PC2 de 7B2 et permet à PC2 de couper son prosegment et de s'autoactiver dans les granules (24). Bref, 7B2 inhibe PC2 jusqu'à destination comme le ferait le prosegment des autres PCs coupé une première fois.

Le domaine catalytique : Le domaine catalytique contient une triade catalytique typique des protéases à sérine, soit un acide aspartique (D), une histidine (H) et une sérine (S). Toutes les PCs, sauf PC2, ont une asparagine (N) au creux de leur cavité oxyanionique. L'environnement de cette cavité permet la stabilisation de la charge négative de l'oxygène du groupe carbonyle du lien peptidique à cliver durant la protéolyse. La chaîne latérale de l'asparagine stabilise la charge négative partielle de l'oxygène en formant un pont hydrogène avec celle-ci. Pour PC2 c'est plutôt un acide aspartique qui réside au creux de la cavité oxyanionique (21). Dans le domaine catalytique des PCs, on retrouve aussi plusieurs résidus chargés négativement comme l'acide glutamique et l'acide aspartique localisés dans les sites S, soit les sites accueillant les résidus basiques positifs des substrats. C'est donc une liaison électrostatique qui assure la liaison de l'enzyme au substrat. Toutes les PCs à l'exception de PC2 préfèrent une arginine (R) en P1 plutôt qu'une lysine (K). P1 représente le résidu de la chaîne peptidique en N-terminal de la coupure.

Le domaine P : Ce domaine de 150 acides aminés, situé immédiatement après le domaine catalytique, est capable de se replier indépendamment du reste de la protéine. Il forme un baril à huit feuillets β interagissant avec le domaine catalytique par des interactions hydrophobes. Ces interactions auraient pour rôle de stabiliser le domaine catalytique qui est instable dû aux répulsions entre les résidus acides des sites S. De plus, les PCs n'ayant pas de domaine P restent prises dans le RE (25, 26). Enfin, le domaine P est responsable de la sensibilité des PCs au pH et au $[\text{Ca}^{2+}]$. Par exemple, si l'on interchange le domaine P de PC1 par celui de la Furine, PC1 réagit au pH et à la $[\text{Ca}^{2+}]$ activant de la Furine (27).

Le domaine C-terminal : Le domaine C-terminal (CT) est le domaine qui offre le plus de variabilité entre les PCs. Le domaine CT de la Furine, PACE4 et PC5 comprend un domaine riche en cystéine (C). De plus, suite au domaine riche en cystéine chez la Furine et PC5-B, cette région est suivie d'une hélice transmembranaire et d'un domaine cytosolique. Le CT de PC7 est analogue à celui de la Furine, mais sans le domaine riche en cystéine. Le CT de PC1 et PC2 est composé d'une hélice α amphipatique (10, 28). Le principal rôle du domaine CT est l'adressage des PC dans les différents compartiments de la voie sécrétoire. Par exemple, le domaine riche en cystéine de PACE4 est responsable de son attachement à la matrice extracellulaire (29). De plus, l'hélice transmembranaire de la Furine, PC5-B et PC7 permet l'encrage de ces enzymes aux membranes du Golgi, du RTG ou de la surface cellulaire. Le domaine cytosolique de la Furine et de PC5-B permet de localiser plus finement ces derniers à ces membranes (10). Plusieurs motifs de cette région chez la Furine ont été identifiés comme responsables de sa localisation dans le RTG, les endosomes et à la surface cellulaire (30). Des motifs semblables chez PC5-B permettent sa localisation dans les compartiments pré-RTG du Golgi (31). L'hélice amphipatique de PC1 et PC2 permet leur localisation dans les granules de sécrétion. L'hélice permet en fait l'interaction de la PC avec la membrane du RTG pour ensuite diriger celle-ci dans les granules (32-34). Le domaine riche en cystéine de PACE4 ralentit la maturation du prosegment de l'enzyme la retenant ainsi plus longtemps dans le RE (35). Quant à la Furine, ce même domaine influence sa sensibilité au processus de *shedding* (clivage) en molécules solubles sécrétées (36). Le CT de PC7 est palmitoylé, prolongeant ainsi la demi-vie de ce dernier sans pour autant influencer sa localisation cellulaire (37, 38).

1.3 La spécificité enzymatique des PCs

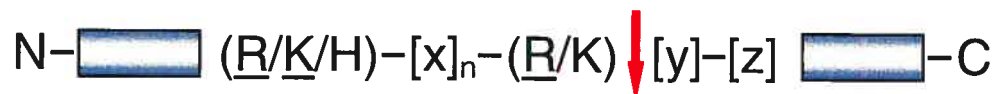
Le clivage par les PCs classiques, de la famille subtilisin/kexin, se fait à des sites de paire d'acides aminés basiques. Or pour ce type de clivage, il y a une nomenclature qu'il est important de mentionner et de comprendre pour bien situer le site de clivage. Une fois la coupure exécutée par la PC, il y a relâche de deux produits. A partir du site de clivage, les résidus de la chaîne peptidique en C-terminal de la coupure sont nommés

par ordre croissant P1', P2', P3' etc. Pour les résidus de la chaîne en N-terminal du site de coupure, on les nomme P1, P2, P3 etc. On représente les sites de PC qui participent à l'interaction avec le substrat de part et d'autre de la coupure par la nomenclature S1, S2, S3, etc, pour les résidus en N-terminal de la coupure et S1', S2', S3' etc. pour les résidus en C-terminal de la coupure (82).

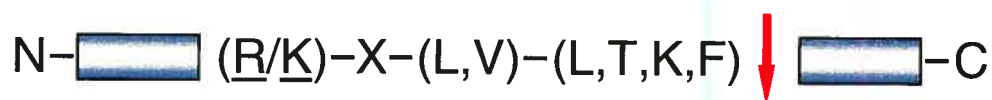
Plusieurs précurseurs protéiques comme les hormones, les enzymes protéolytiques, les facteurs de croissance, les récepteurs membranaires, les molécules d'adhésions, les facteurs de transcription, etc. s'avèrent être des substrats des PCs. Les PCs sont aussi impliquées dans l'activation de certaines glycoprotéines de pathogènes tels que le VIH (virus d'immunodéficience acquise), le SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère), l'hémagglutinine du virus de la grippe aviaire et celui de la toxine de l'Anthrax (39-41). Les sept PCs, soit la Furine, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 et PC7 ont une spécificité enzymatique pour un et/ou une paire de résidus basiques dont le motif typique est **ArgLys-(X)_n-Arg** où $n = 0, 2, 4, 6$ et X est n'importe quel acide aminé à l'exception de la Cys. En tant que tel, il y a quatre différents types de coupures à des paires d'acides aminés basiques répertoriées selon les PCs. La Furine et PC7 coupent les précurseurs ayant des sites de clivage du type **[R-X_n-(K/R)-R]**. Ceci représente le type I. PC1 et PC2 reconnaissent les sites du type **[(K/R)-(K/R)]** représentant le type II. Le type III inclut les coupures qui se font à des sites **[R-X_n-R]** et le type IV reconnu par PC5 inclut les coupures faites à des précurseurs qui ont une Lys ou une Arg en P2' [**P2' = K/R**] (42) (**Figure 8**).

Une fois que les PCs ont exécuté leur clivage, les paires d'acides aminés basiques en C-terminal sont souvent retirées par une carboxypeptidase. Si après l'intervention de la carboxypeptidase, il se trouve un résidu glycine, une enzyme nommée PAM (*peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase*) catalysera l'amidation de ce résidu. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles à la pleine activité des hormones générées (10, 21, 42, 43).

**Motifs de paire d'acides
aminés basiques**



SKI-1/S1P



PCSK9



Figure 8: Spécificité de coupure des proprotéines convertases

n = 0, 2, 4 ou 6

x = tous les acides aminés sauf Cys

y = petits acides aminés (Ser, Thr, Ala et parfois Gly)

z = résidu hydrophobe comme Leu, Ile, Val, Tyr ou Phe

1.4 Les inhibiteurs des PCs

L'étude des PCs a mené par la suite à la recherche et au développement d'inhibiteurs de celles-ci. Plusieurs d'entre eux sont de petites molécules incapables de traverser la membrane plasmique, empêchant ainsi leur action sur les PCs par la voie extracellulaire ou *in vivo*. D'autres inhibiteurs spécifiques sont des protéines qui peuvent être facilement exprimées dans les différentes lignées cellulaires par transfection.

En plus de son rôle dans le repliement de PC2, 7B2 est un inhibiteur spécifique dont l' IC_{50} est de l'ordre du nanomolaire. L'inhibition se fait à l'aide de la portion C-terminal de la protéine et de deux motifs, soit le motif KK et VNPYLQG. Le doublet de lysines (KK) entre dans le site actif de PC2 bloquant ainsi l'accès au substrat faisant de 7B2 un inhibiteur compétitif. Le motif VNPYLQG se lie dans le domaine catalytique de PC2 renforçant l'inhibition de l'enzyme (44). En cela, il y a un paradoxe, car 7B2 est un activateur de PC2. Ce qui se passe en fait, c'est que la PC2 coupe au site KK, détachant ainsi 7B2 de l'enzyme afin d'être activée (45).

L'inhibition de PC1 se fait à l'aide d'une granine du nom de SAAS. Cet inhibiteur compétitif spécifique à PC1, agit avec un IC_{50} de l'ordre du nanomolaire. De plus, elle est dirigée vers la sécrétion régulée (46). Sa fonction inhibitrice réside dans sa partie C-terminale (44). Le motif inhibiteur de SAAS est la séquence LLRVKR. Cette séquence a aussi la propriété d'inhiber efficacement plusieurs PCs comme la Furine et PC5-A *in vitro* (47). Cependant, SAAS est instable lorsqu'il interagit avec PC1. Ce dernier finit par le cliver au site LLRVKR inactivant ainsi sa fonction inhibitrice. Ainsi, SAAS ne fait que retarder l'activation de PC1 sans pour autant diminuer son activation. L'inhibition par la SAAS ressemble beaucoup à celle de 7B2 (48).

Comme nous l'avons vu auparavant, les prosegments inhibent les PCs jusqu'à ce qu'elles arrivent au bon compartiment. L'approche d'inhibition par surexpression de ces prosegments a donné de bons résultats contre la Furine, PC7 et PC5-A *ex vivo* (49). Par ailleurs, les prosegments se comportent comme des inhibiteurs compétitifs dont l' IC_{50} est de l'ordre du nanomolaire *in vitro* et dont l'inhibition dépend de la présence du site primaire (50). Le site primaire du prosegment est une séquence consensus reconnue et

clivée par la PC afin celle-ci puisse se débarrasser de son prosegment pour s'autoactiver. S'il advient une mutation dans cette séquence, la PC pourrait être incapable de se défaire de son prosegment et du même coup, de s'activer. Un fait intéressant est que le site primaire seul n'est pas suffisant pour l'inhibition. Ceci suggère qu'il y a plusieurs motifs dans les prosegments qui aideraient à la stabilisation du complexe enzyme/inhibiteur lors du clivage du prosegment (51).

La PDX (*α 1-antitrypsine Portland*) une serpine dérivée de l' α 1-antitrypsine, est un inhibiteur de type suicide spécifique à l'élastase (30). L'inhibition par l' α 1-antitrypsine se fait par l'insertion de sa boucle réactive dans le site actif de l'élastase. Cette boucle flexible de 17 acides aminés, exposée au solvant, contient le motif reconnu par l'élastase, soit la séquence **AIPM**. Une fois introduite, la sérine de l'élastase attaque le groupement COOH de la méthionine en P1 pour former l'intermédiaire acyle-enzyme, permettant ainsi la libération de la région C-terminale du motif de reconnaissance. Sitôt l'intermédiaire acyle-enzyme formé, le résidu en P1 se retire vers l'intérieur de la serpine, entraînant du même coup la sérine active de l'élastase. Ceci a pour effet de déformer le site actif de la protéase et de causer son inhibition définitive (52). Une des mutations naturelles de l' α 1-antitrypsine est celle qui change la méthionine en P1 pour une arginine, menant au motif **AIPR**. Cette mutation change la spécificité de la serpine, causant ainsi l'inhibition de la thrombine responsable de la coagulation du sang au lieu de l'élastase (53). Ceci amena l'idée de muter le motif de reconnaissance **AIPM** de l' α 1-antitrypsine à **RIPR**. Ceci engendra un substrat suicide contre la Furine et les autres PCs (30). Cet inhibiteur appelé la PDX inhibe avec un IC_{50} de l'ordre du nanomolaire la Furine, PC1 et PC5 et de l'ordre du micromolaire PC2 (54). PACE4 et PC7 ne sont pas affectés par le PDX *in vitro* (54), malgré que certains laboratoires ont démontré une certaine inhibition dans certaines lignées cellulaires comme les AtT20, les GH4C₁ et le BSC40 (55, 56).

1.5 Les PCs atypiques

En plus des sept convertases clivant aux paires d'acides aminés basiques, il y a un huitième membre nommé SKI-1/S1P qui possède plutôt une homologie avec la pyrolysine. SKI-1/S1P possède une spécificité enzymatique pour la coupure de molécules ayant un motif consensus **R/K-X-(résidu hydrophobe)-Z** où Z est préférentiellement une Leu ou une Thr. Les Val, Pro, Glu, Asp ou Cys ne sont pas favorisés à la position Z du site de clivage (57, 58). SKI-1/S1P joue plusieurs rôles importants dans la cellule. Il est impliqué dans l'activation de facteurs de transcription, reliés à la régulation des gènes du métabolisme du cholestérol et des lipides, par l'intermédiaire du SREBP (*Sterol regulatory element binding protein*). Il joue aussi un rôle dans la réponse au mauvais repliement protéique au niveau du RE, par l'activation des facteurs ATF6 et OASIS (10, 59, 60). Voici comment SKI-1/S1P active les facteurs de transcription régulant le cholestérol. Lorsque la cellule a suffisamment de cholestérol, la protéine INSIG (*insulin-induced protein*) retient le complexe SREBP/SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) dans le RE. Or, lorsqu'il y a un manque de cholestérol, INSIG se détache du complexe pour que ce dernier puisse être transporté vers l'appareil de Golgi par les vésicules de transport couvertes de COPII. Arrivé au *cis* et *median*-Golgi, le SREBP rencontre SKI-1/S1P afin qu'il puisse être clivé par ce dernier au site RSVL⁵²²↓S formant ainsi deux fragments, soit un fragment contenant un motif hélice-boucle-hélice (bHLH) et l'autre restant attaché à SCAP. Le produit du clivage du SKI-1/S1P devient le substrat de la seconde protéase nommé S2P, une métalloprotéase. Par la suite, S2P coupe le fragment contenant le motif bHLH au site DRSRILL⁴⁸⁴↓C à l'intérieur même de la membrane du Golgi, libérant ainsi la partie N-terminale contenant le motif bHLH. Ce fragment est ensuite transloqué vers le noyau provoquant ainsi l'activation de nombreux gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, des acides gras et du gène du LDL-R (61-63). Des variantes plus spécifiques à SKI-1/S1P de l' α 1-antitrypsine, avec les séquences RRVL³⁵⁸ et RRYL³⁵⁸ et un mutant R134E du prosegment, peuvent être utilisées en tant qu'inhibiteur pour l'activation de SREBP-2 et d'ATF6 (59).

1.6 PCSK9

Le neuvième membre de la famille des PCs est PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin kexin 9*) ou auparavant nommé NARC-1 (*neural apoptosis regulated convertase 1*). PCSK9 est une sérine protéase indépendante du calcium proche parente de la protéinase K. PCSK9 possède une spécificité autocatalytique pour la séquence $SSV^{P4}FAQ^{152}\downarrow SIP^{P3'}WN$ où la Val en P4 et la Pro en P3' sont essentiels au clivage du prosegment (64, 65). Jusqu'à ce point, aucun substrat n'a été identifié pour PCSK9, bien que l'on sache qu'elle s'autoclive comme les autres PCs. Malgré tout, plusieurs mutations naturelles dans la partie codante du gène ont été répertoriées causant l'hypercholestérolémie familiale, soit les mutations S127R, F216L, et D374Y et d'autres causant l'hypocholestérolémie familiale, soit Y142X et C679X. Ce sont des mutations non-sens résultant en des protéines tronquées (66-68).

PCSK9 a été cloné par deux compagnies pharmaceutiques d'une part, par une analyse générale des gènes exprimés dans la voie sécrétoire et d'autre part par l'induction de l'apoptose de neurones du cervelet (65). *Seidah et al* ont pu identifier la convertase PCSK9 par une étude d'homologie de séquence en utilisant des oligonucléotides dégénérés comparables à la séquence du domaine catalytique conservé de SKI-1/S1P. La séquence d'acide aminé de PCSK9 exhibe environ 42% de similarité à celle de la protéinase K. Premièrement, elle est synthétisée sous forme de zymogène, qu'on nomme proPCSK9 (662 acides aminés). Par la suite, elle s'autoclive dans le RE au site $SSV^{P4}FAQ^{152}\downarrow SIP^{P3'}WN$ et est sécrétée sous forme de PCSK9 mature (540 acides aminés) complexée à son prosegment de 14 kDa dans le milieu extracellulaire (65, 69). Comparativement à la spécificité de coupure des autres PCs, on remarque un acide aminé non polaire en P1 suivi de résidus hydrophobes de P2 à P4. En tant que tel, les PCs préfèrent en P1/P2 un résidu basique (Arg/Lys) à l'exception de SKI-1/S1P qui préfère les résidus hydrophobes près du site de coupure; nécessitant quand même une Arg/Lys en P4. Pour l'autoactivation de PCSK9, les résidus Val^{P4} et Phe^{P3} semblent importants en P4 et la Phe est préférable en P5. Ceci suggère entre autres une structure en épingle à cheveux en P3'. Bien que le domaine P soit absent, la région C-terminale contient une région riche en résidu cystéine et histidine, très importante pour l'activité autocatalytique (64, 65). *Benjannet S et al 2004* ont démontré que certaines mutations

comme : Y78A, V80A, V80L, L82P, M126A P138Y et V149A induites dans le prosegment de PCSK9, peuvent empêcher sa sécrétion dans le milieu extracellulaire à cause d'un mauvais repliement du domaine catalytique ou simplement parce que le prosegment n'est plus clivé par la convertase. C'est le cas de la mutation V149A qui ne crée que de la proPCSK9. Jusqu'à présent, aucun substrat, autre que son propre prosegment, n'a été trouvé. Cependant, les différentes mutations naturelles et induites nous permettent de faire une analyse structure/fonction afin de déterminer la spécificité et la sensibilité de cette convertase (**Figure 9**).

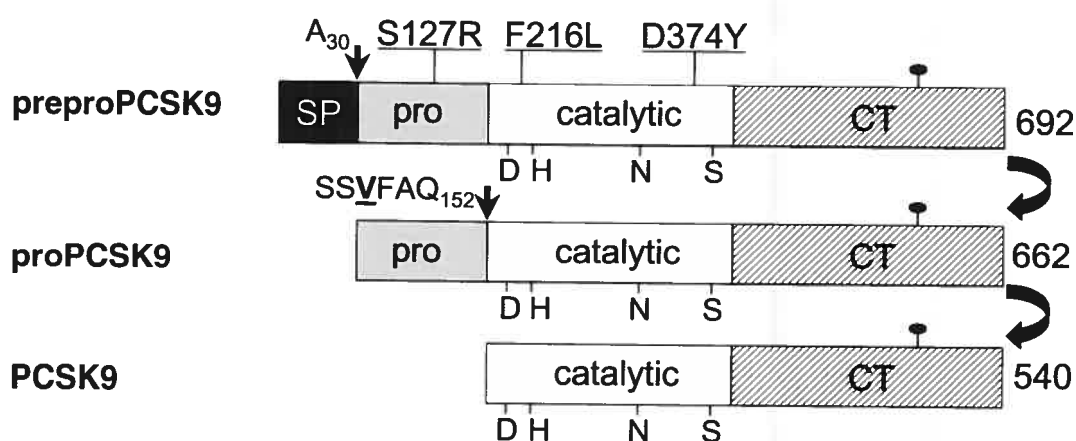


Figure 9 : Représentation schématique de la maturation de PCSK9 et de ses mutations

Dans le réticulum endoplasmique, PCSK9 est débarrassé de son peptide signal (SP) durant sa traduction pour devenir de la proPCSK9. Par la suite, celle-ci s'active en se débarrassant de son prosegment (Pro) en s'autoclivant au site SSVFAQ↓SIP. Ce clivage est effectué par le site catalytique de PCSK9 (Catalytic) composé de la triade catalytique **D** (acide aspartique), **H** (histidine) et **S** (sérine) responsable de la catalyse. Le résidu **N** (asparagine) formant l'oxyanion dans la poche catalytique, participe aussi à la catalyse. Nous avons aussi représenté les différentes mutations de PCSK9 ainsi que les sites de N-glycosylation par les boules noires dans la partie C-terminale (CT). Figure tirée de la référence (64)

1.6.1 L'implication de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol

L'hypercholestérolémie familiale (FH) est une maladie qui a pour conséquence un taux élevé de lipoprotéines de faible densité, LDL (*low density lipoprotein*) dans le sang. Ceci peut causer par la suite de l'athérosclérose dans les artères coronaires pouvant mener à des crises cardiaques. Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein, les lauréats d'un prix Nobel en 1985, ont identifié des mutations dans le gène du récepteur des LDLs (LDL-R), responsables d'une des formes de FH. Ce fut la première cause de FH identifiée (70). Plus tard, d'autres mutations, cette fois dans l'apolipoprotéine B (apoB), la protéine entourant les particules de LDL afin d'assurer leur dissolution dans le sang et leur catabolisme, ont permis de trouver la deuxième cause de FH. Malgré cela, certains sujets souffrant d'hypercholestérolémie familiale, mais n'ayant pas ces deux types de mutations ont mené à l'identification d'un troisième gène (71). Ce troisième gène recherché était celui de PCSK9. Les différentes mutations répertoriées dans le gène de PCSK9 comme S127R, F216L, D374Y et N157K montrèrent son implication dans la FH (66, 68, 72). Ces mutations suggèrent un gain de fonction par rapport au type sauvage. A l'opposé, les mutations Y142X et C679X présentent des formes tronquées de la convertase PCSK9 résultant en une baisse de 40 % du cholestérol circulant (CL), soit une perte de fonction (67).

Le rôle de PCSK9 fut déterminé par l'infection de souris par un adénovirus recombinant de PCSK9. Ils ont observé que la PCSK9 favorisait la dégradation du LDL-R menant à une augmentation des LDL circulantes. Ceci se confirme par le fait que les souris mutantes KO de PCSK9 ont au contraire une baisse des LDL circulantes due à la baisse de la dégradation du LDL-R. Jusqu'à ce jour, le mécanisme par lequel la PCSK9 dégrade le LDL-R n'est pas encore connu. Une étude a démontré que l'action de la PCSK9 se fait dans un compartiment post-golgien (73) et qu'un pH acide est critique (64, 78). Il fut montré que PCSK9 est fortement exprimée dans le foie et le petit intestin (65).

1.6.2 La régulation de PCSK9

La régulation de PCSK9 se fait tant au point de vue transcriptionnel qu'au niveau de sa dégradation. Il faut comprendre que c'est l'homéostasie du cholestérol expliquée précédemment, impliquant le SREBP, qui est la pierre angulaire de l'expression du LDL-R et de la PCSK9. *Maxwell KN et al* en 2003 ont entrepris une expérience avec des souris dont la diète était riche en cholestérol. On s'attendait à une diminution de l'activité des SREBPs due à l'excès de cholestérol dans le sang des souris. En effet, les gènes du LDL-R, PCSK9 et de la HMG CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase), l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol, ont subi une baisse de leur expression (74). Une autre approche, cette fois en utilisant des souris transgéniques pour les gènes de SREBP-1a et SREBP-2 et *knockout* pour SCAP, a démontré que l'ARNm de PCSK9, ainsi que d'autres gènes responsables du métabolisme du cholestérol, étaient à la hausse chez ces souris (75). *Dubuc G et al* ont démontré, par l'utilisation de lignée cellulaire et de cultures primaires d'hépatocytes, que le traitement avec les statines, des inhibiteurs de la HMG CoA réductase, augmentait davantage l'expression de la PCSK9 que celui du LDL-R (76). Nous savons que le facteur de transcription SREBP-2 augmente les niveaux d'ARNm du LDL-R et de PCSK9. Nous savons aussi que cette dernière favorise la dégradation du LDL-R. Donc, nous pouvons affirmer que PCSK9 est un régulateur post-traductionnel du niveau protéique du LDL-R. Ceci a motivé l'idée de développer un inhibiteur spécifique de PCSK9 auquel, combiné avec des statines, pourrait être utilisé pour le traitement de patients hypercholestérolémiques. *Rashid S et al* ont démontré, à l'aide de souris déficientes en PCSK9 que l'utilisation des statines résulte en une plus grande réduction du cholestérol plasmique (40.8 mg/dL) comparativement à des souris de type sauvage traitées simplement aux statines (71mg/dL) (77). *Benjannet S et al* ont fait la dernière découverte à propos de la régulation de PCSK9. Ils ont montré que la Furine ainsi que PC5 sont responsables d'un clivage de PCSK9. Ainsi, ces deux convertases clivent dans la triade catalytique, et ce, dans un compartiment tardif. Ceci aurait pour conséquence d'inactiver cette convertase tout en relâchant du même coup son prosegment. Les fragments ainsi générés sont par la suite sécrétés comme le serait la PCSK9 non clivée. De plus, ils ont aussi montré que ces fragments étaient naturellement présents dans le plasma humain. La mutation R218S de PCSK9 a aussi démontré une résistance à ce

clivage. Enfin, le mutant D374Y a montré le plus grand gain de fonction de la convertase. C'est le mutant qui mène à la plus grande dégradation du LDL-R comparativement au type sauvage et aux autres mutants hypercholestérolémiques. De plus, il démontre aussi une plus grande résistance à la Furine (78) (**Figure 10**).

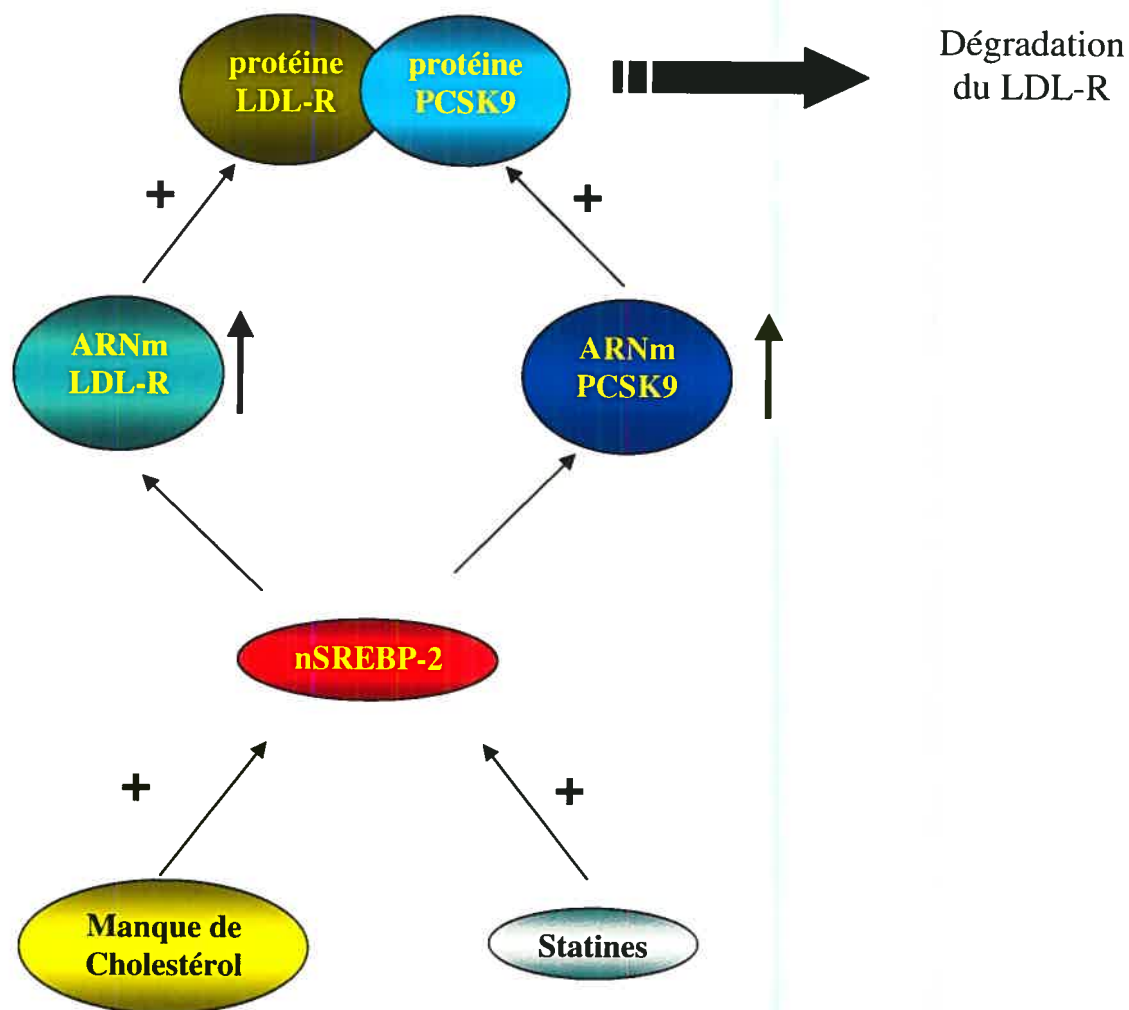


Figure 10 : Régulation post-traductionnelle du LDLR par PCSK9

Un manque de cholestérol dans le milieu cellulaire ou une inhibition de la HMG-CoA réductase, par les statines, diminue la concentration de cholestérol intracellulaire activant ainsi le SREBP-2. Ceci mène à l'expression du LDL-R, pour augmenter la captation du LDL circulant et de PCSK9 pour réguler cette captation en dégradant le LDL-R à son tour.

1.7 Objectif de la recherche

Le laboratoire du Dr Timothy L Reudelhuber a conçu une protéine de fusion nommée Fc-ACE₂-Fusion. Cette construction protéique a la propriété d'être très stable, versatile et facile d'utilisation afin de pouvoir trouver des inhibiteurs potentiels de PCs. Celle-ci est composée de sa partie N-terminale vers son C-terminale d'un peptide signal (afin qu'elle puisse passer dans la voie sécrétoire comme les PC), de l'épitope hémagglutinine du virus de l'influenza (HA), d'une séquence peptidique variable reconnue et clivée par la PC, d'un corps composé de la partie Fc de l'IgG 2B de souris et de la queue cytoplasmique, incluant le transmembranaire, de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE₂). L'objectif était d'utiliser la construction dans un test colorimétrique afin de pouvoir cribler une banque combinatoire de drogues et trouver un inhibiteur potentiel pour les neuf PCs présentées auparavant. Cette construction a fait ses preuves avec la Furine (résultats montrés ultérieurement). Le but du projet de maîtrise était de façonner cette construction afin de pouvoir cibler la convertase PCSK9 et pouvoir ultérieurement lui trouver un inhibiteur potentiel. La nécessité de trouver un inhibiteur est basée sur les résultats de l'expérience faite chez les souris KO traitées ou non avec les statines, ainsi qu'avec les mutants naturels de PCSK9 trouvés chez les patients hypocholestérolémique (77). De plus, l'avantage de cette construction est qu'elle peut rapidement nous démontrer de l'activité enzymatique en *trans* de PCSK9.

Matériels et Méthodes

Chapitre II: Matériels et Méthodes

2.1 Les constructions FC-ACE2-Fusion pour PCSK9

En premier lieu, nous avons pris comme patron le vecteur nommé *VII60*, décrit auparavant, provenant du laboratoire du Dr Timothy L Reudelhuber. Les séquences variables reconnues par PCSK9 utilisées pour ce projet sont ¹⁴⁷SSVFAQSIP¹⁵⁵ et ¹⁴⁷SSVFAQSIPWN¹⁵⁷. Ceux-ci correspondent à la séquence du prosegment de PCSK9 permettant son autoactivation. De plus, nous avons dû rallonger la queue C-terminale de ACE₂ afin d'avoir les motifs d'internalisation de ACE₂, soit les séquences NPXY et YXXΦ.

Tableau I : Amorces d'oligonucléotides utilisées pour les différentes PCRs afin d'obtenir les séquences PCSK9. Les amorces ont été commandées d'Invitrogen.

Amorces	Séquences	Orientation	Indications
1150	GAGAACCCACTGCTTACTGG	sens	Avant le site de restriction HindIII dans <i>pcDNA₃</i>
1151	GCTGATCTGGACGTCTGGG	antisens	<i>pcDNA₃</i> plus Fc
29302	CTCCGTGTTTCGCTCAGTCCATCCCGGATCCGGTCGAGGGTGGAC	sens	SIP
29303	GGACTGAGCGAACACGGAGGAAAAGGTGGTGGTGTGCGGCGTAG TC	antisens	SIP plus HA
29304	CTCCGTGTTTCGCTCAGTCCATCCCGTGGAACCCGGATCCGGTC GA	sens	SIPWN

Pour le changement de la séquence de PC1/3, PC5/6 à celle de PCSK9, soit SSVFAQSIP, nous avons procédé à une première PCR, avec les amorces 1150 contre 29303, pour créer le début de la séquence (SSV...) ainsi qu'avec les amorces 29302 contre 1151 pour créer la fin de la séquence (... QSIP). Le vecteur utilisé dans les deux cas est le *VII60* à 52°C. Vingt cycles ont été effectués. Ceci sert à concevoir les deux moitiés de la séquence SSVFAQSIP. Pour la séquence SSVFAQSIPWN, la première PCR fut faite de la même manière, mais avec les amorces 1150 contre 29303 pour la

première moitié et avec les amorces 29304 contre 1151 pour l'autre moitié. Le produit des premières PCRs, pour les deux séquences, nous a servi de matrice pour la deuxième PCR. Celle-ci sert à consolider les deux moitiés de séquence pour aboutir à la séquence complète. Les amorces utilisées dans les deux cas sont 1150 et 1151 à 52°C. Vingt cycles ont été effectués. Toutes ces PCRs ont été faites dans un volume final de 50 µl en utilisant 2 µl de l'*Elongase Enzyme Mix* d'Invitrogen. Ceci nous permet finalement d'avoir les séquences SSVFAQSIP/WN avec de part et d'autre des sites de clivage pour les enzymes de restriction HindIII et PmlI (**Figure 11**). Un gel de 2% agarose fut effectué pour récupérer les produits de PCR à environ 300pb. Les bandes de gel de PCR ont été par la suite récupérées et purifiées par le kit QiaEX de QIAGEN tel que mentionné dans le protocole du guide de l'utilisateur 2003. Les produits de PCR purifiés obtenus (20 µl) ainsi que le vecteur VII60 (1.6 µg) ont été digérés par l'enzyme HindIII 10 U/µl d'Invitrogen dans un volume de 25 µl et de 20 µl final, respectivement, toute la nuit à 37°C en présence du tampon 2 (NEB) (*New England Biolab*) à 10 % du volume total. 10 U de HindIII ont été utilisés pour digérer les produits de PCR et 20 U pour le vecteur VII60. Suite à cela, les produits de PCR et le vecteur ont été digérés par PmlI dans 40 µl final dans les deux cas avec cette fois, le tampon 1 (NEB) afin que la quantité de tampon final soit de 10 % du volume total de digestion avec PmlI. 4 µl de BSA 10X ont été utilisés pour la digestion à 37°C durant la nuit. Des gels d'agarose de 2 % et 0,8 % respectivement ont été faits pour extraire les produits de PCR ainsi que les vecteurs digérés par les enzymes de restrictions. Les bandes d'environ 250 pb (digestions des produits PCR) et de 6 kb (le vecteur digéré) ont été récupérées et purifiées par kit QiaEX pour la ligation. La ligation s'est faite dans 10 µl final à 16°C durant la nuit dans un bain-marie avec agitation. 1 µl de vecteur et 7.5 µl, de fragments PCR digérés ont été ligasés avec la T4 DNA ligase (NEB) et 1 µl de tampon de ligation 10X (NEB). La transformation a été effectuée avec des bactéries compétentes DH5α de BRL par la méthode du choc thermique. La discrimination des clones s'est faite sur un milieu LB contenant 100 mg/µl d'ampicilline. Les clones obtenus ont été séquencés et amplifiés comme décrit dans le protocole du QIAGEN *Plasmid Purification Handbook*. Ceci nous permet d'avoir les nouveaux vecteurs nommés *pcDNA₃ FC-ACE₂-Fusion NARC SP9(SP9)* (SSVFAQSIP) et *pcDNA₃ FC-ACE₂-Fusion NARC SN11 (SN11)* (SSVFAQSIPWN).

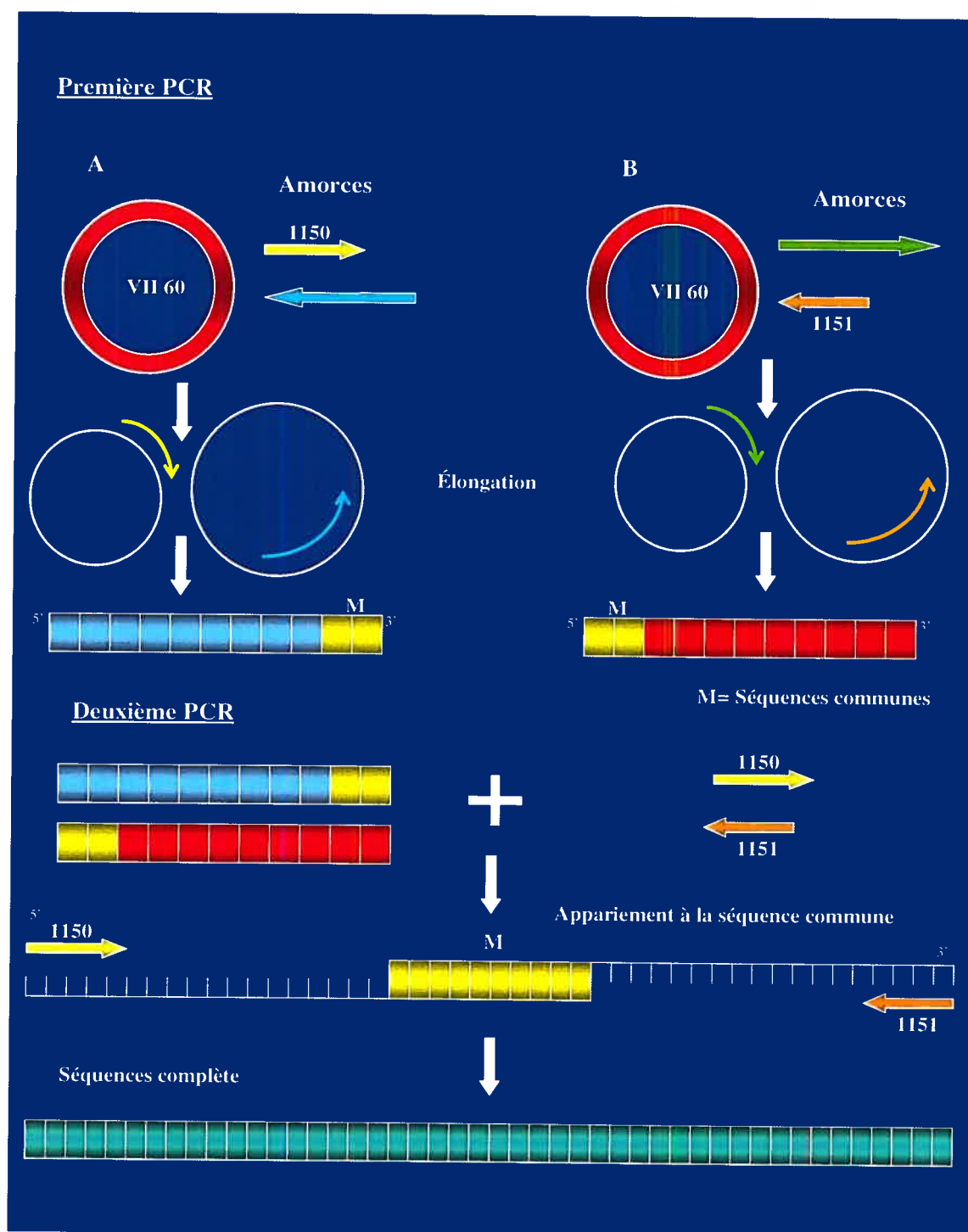


Figure 11 : PCRs utilisées pour la fabrication des constructions *Fc-ACE₂-Fusion*

Pour l'allongement de la queue C-terminale d'ACE₂, nous avons utilisé ces amorces pour les PCRs mentionnés au tableau II. Seul la construction *SN11* a subi cette allongement.

Tableau II : Amorces utilisées pour les différentes PCRs pour l'allongement de la queue C-terminale d'ACE₂ de *SN11*. Les amorces ont été commandées d'Invitrogen.

Amorces	Séquences	Orientation	Indications
1150	GAGAACCCACTGCTTACTGG	sens	Avant le site de restriction HindIII dans pcDNA ₃
1166	ATCTCCCGGTCTCCGGGTAAAGATCTGCCCCCTGTTTC CATATGGCTG	sens	Début de la queue C-terminale d'ACE ₂ dans pCI neo/h ACE ₂
1167	AATAGGGCCCCCTAAAAGGAGGTCTGAACATC	antisens	Fin de la queue C-terminale d'ACE ₂ dans pCI neo/h ACE ₂

Pour l'allongement de la queue C-terminale d'ACE₂, nous avons procédé à une première PCR avec les amorces 1166 contre 1167 avec le vecteur *pCI neo/h ACE₂* à 48°C. Vingt cycles ont été effectués. Ceci nous permet d'obtenir la séquence complète de la queue C-terminale d'ACE₂. Le produit de cette PCR nous sert de matrice pour la deuxième PCR. La deuxième PCR sert à intégrer la séquence de la queue C-terminale d'ACE₂ à la construction *SN11* avec, de part et autre, des sites de restriction pour HindIII et ApaI. La deuxième PCR s'est faite avec les amorces 1150 contre 1167 avec le produit de la première PCR (2 µl) comme matrice et le vecteur *SN11* (660ng). 5 cycles ont été faits à 50°C et 15 autres cycles ont été faits à 55 °C de T_m. Tous ces PCRs ont été faits à 50 µl final en utilisant 2 µl de l'*Elongase Enzyme Mix* d'Invitrogen. Un gel de 0,8% agarose fut effectué pour récupérer les produits de PCR à environ 1,1 kb. Les bandes du gel de PCR ont été par la suite récupérées et purifiées par le kit QiaEX de QIAGEN tel que mentionné par le protocole du guide de l'utilisateur 2003. Une ligation a été faite dans le vecteur *pDRIVE* de QIAGEN comme montré dans leur manuel de l'utilisateur *QIAGEN PCR Cloning Handbook*. Dans ce cas, le *pDRIVE* a été utilisé pour améliorer la qualité des digestions enzymatiques et pour augmenter la quantité de l'insert. Les clones sélectionnés (blancs ou bleus) ont été amplifiés et lysés par

l'ensemble GFX d'Amersham. Un gel de 0,8% agarose fut effectué pour vérifier les clones ayant le vecteur et l'insert. Les clones ayant des bandes à 5 kb et 10 kb furent sélectionnés. Ceux-ci furent digérés par l'enzyme *ApaI* de BRL (10 U/ μ l) dans un volume final de 30 μ l toute la nuit à la température de la pièce en présence du tampon 4 (NEB) et de BSA à 10% de volume final. 20 U d'*ApaI* ont été utilisées. Par la suite, cette même digestion fut complètement utilisée pour la digestion avec *HindIII* (20 U), dans un volume final de 40 μ l, à 37°C durant la nuit. 4 μ g de vecteur *SN11* furent digérés par *ApaI* (30 μ l finale) et par la suite par *HindIII* (50 μ l finale) avec les mêmes conditions que pour les inserts. La ligation s'est faite dans 10 μ l final à 15°C durant la nuit dans un bain-marie avec agitation. 2 μ l de vecteur ainsi que 4 μ l d'insert ont été ligués avec la T4 DNA ligase (NEB) avec 2 μ l de tampon de ligation 5X (NEB). La transformation ainsi que la discrimination des clones furent effectuées de la même manière que pour la confection des séquences PCSK9 vu auparavant. Ceci nous permet d'obtenir le nouveau vecteur nommé *pcDNA₃ FC-ACE₂-Fusion NARC SN11 CT-FL-ACE₂ (SN11CT-FL-ACE₂)*.

Pour la mutation de V→A (Valine en Alanine) de la séquence *SSVFAQSIPWN* nous avons utilisé ces amorces pour les PCR mentionnés au tableau III.

Tableau III : Amorces utilisées pour les différentes PCRs pour la mutation de V→A (Valine en Alanine) de la séquence *SSVFAQSIPWN*. Les amorces ont été commandées d'Invitrogen.

Amorces	Séquences	Orientation	Indications
1150	GAGAACCCACTGCTTACTGG	sens	Avant le site de restriction <i>HindIII</i> dans <i>pcDNA₃</i>
1151	GCTGATCTGGACGTCTGGG	antisens	<i>pcDNA₃</i> plus Fc
29415	GAGCGAACGCGGAGGAAAAG	antisens	HA plus Mutation V→A
29418	TTCCTCCGCGTTCGCTCAGTC	sens	Mutation V→A

Pour la mutation de V→A (Valine en Alanine) de la séquence *SSVFAQSIPWN*, nous avons procédé à une première PCR avec les amorces 1150 contre 29415 pour

obtenir le début de la séquence (SSA...) ainsi qu'avec les amorces 29418 contre 1151 pour obtenir la fin de la séquence (... QSIPWN). Le vecteur utilisé dans les deux cas est le *SN11CT-FL-ACE₂* à 52°C. Vingt cycles ont été effectués. Ceci sert à concevoir les deux moitiés de la séquence SSAFAQSIPWN. Le produit des premières PCR nous a servi de matrice pour la deuxième PCR. Celle-ci sert à consolider les deux moitiés de séquence pour aboutir à la séquence complète. Les amorces utilisées dans les deux cas sont 1150 et 1151 à 52°C. Vingt cycles ont été effectués. Toutes ces PCR ont été faites à 50 µl final en utilisant 2 µl de l'*Elongase Enzyme Mix* d'Invitrogen. Ceci nous permet finalement d'avoir les séquences SSAFAQSIPWN avec de part et d'autre des sites de clivage pour les enzymes de restriction HindIII et BamHI. Un gel de 2 % agarose fut effectué pour récupérer les produits PCRs à environ 300 pb. Les bandes de gel de PCR ont été par la suite récupérées et purifiées par le kit QiaEX de QIAGEN tel que mentionné par le protocole de 2003 de leur guide de l'utilisateur. Les produits de PCR purifiés obtenus (20 µl) ainsi que le vecteur *SN11CT-FL-ACE₂* (1.07 µg/µl) ont été digérés par l'enzyme HindIII 10 U/µl d'Invitrogen dans un volume de 25 µl final pendant 4h à 37°C en présence du tampon 2 (NEB) à 10 % de volume total. 10 U de HindIII ont été utilisées pour digérer les produits de PCR et 20 U pour le vecteur *SN11CT-FL-ACE₂*. Suite à cela, les produits de PCR et le vecteur ont été digérés par BamHI dans 30 µl final. 1 µl de NaCl (1.5M) ainsi que de l'eau (pour arriver à 30 µl final) ont été ajoutés dans les deux cas à la digestion précédente d'HindIII pour la digestion par BamHI à 37°C durant la nuit. Des gels d'agarose de 2% et 0,8% ont été faits respectivement pour extraire les produits de PCR et le vecteur digéré par les enzymes de restrictions. Les bandes d'environ 250pb (les digestions des produits de PCR) et de 6 kb (le vecteur digéré) ont été récupérées respectivement, afin d'être purifiées par le kit QiaEX pour procéder à la ligation. La ligation du 1 µl de vecteur avec 6 µl de fragments PCR digérés, la transformation ainsi que la discrimination des clones furent effectuées de la même manière que pour la confection des séquences PCSK9 vue auparavant. Ceci nous permet d'avoir le nouveau vecteur nommé *pcDNA₃ FC-ACE₂-Fusion NARC SN11 CT-FL-ACE₂ V/A (SN11 CT-FL-ACE₂ V/A)*.

2.2 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HuH7 (Dr François Jean, *University of British Columbia*) ont été cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) (*Gibco BRL*) 10% FBS (*fetal bovine serum*) (*Wisent*) + 25 µg/µl gentamicine (GTM) (*Wisent*). Les cellules HepG2 (Dr Caroline Rochon, Hôpital Royal Victoria) ont été cultivées dans du DMEM 10% FBS, 25 µg/µl GTM et les cellules HEK 293 (Dr Jean Davignon Institut de recherches cliniques de Montréal) dans du DMEM sans sodium pyruvate 10% FBS, 25 µg/µl GTM. Toutes les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% CO₂. Les cellules HuH7 et HepG2 ont été transfectées dans des pétris P 3,5 (3.5cm) avec la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) selon le protocole du fabricant, soit 4 µg d'ADN pour 10 µl de lipofectamine. Les cellules HEK 293 furent transfectées dans des pétris P3.5 (3.5cm) avec l'Effecten (*Qiagen*) selon le protocole du fabricant. Certaines expériences ont été effectuées en présence de décanoyl-RVCR-chlorométhylcétone (décanoyl-RVCR-CMK) (*Bachem*) à 50 µM et/ou avec du NH₄Cl 10 mM. Tous les cDNA de PCSK9, ses mutants et les autres PCs ont été clonés dans *pIRES₂-EGFP* avec ou sans l'épitope V5 en C-terminal.

2.3 Immunofluorescence et microscopie confocale

Les HuH7 ont été préparées (7000 cellules/chambre) dans des chambres-lamelles pour le microscope (NUNC, *Rochester, NY*) et ont été transfectées le jour suivant. 48 h post-transfection, les cellules ont été fixées avec 3% paraformaldéhyde (PFA) pendant 30 min à 4°C, incubées par la suite pendant 1h dans une solution 5% de sérum de chèvre et 0.1 % Triton X-100 pour le blocage et la perméabilisation. Les cellules ont été par la suite incubées pendant 60 min avec l'anticorps anti-IgG de souris préparé chez la chèvre et conjugué au fluochrome Alexa 555 (*Invitrogen*) et ou/avec l'anticorps anti-HA de souris conjugué au fluochrome Alexa 488 tous deux à 10 µg/ml. L'analyse d'immunofluorescence a été faite avec un microscope confocal Zeiss LSM-510. Pour les conditions non-perméabilisantes, on a omis de mettre du Triton X-100 dans la solution de blocage.

2.4 Solubilisation des protéines, Western blot et immunodétection

Les cellules ont été lavées et incubées 30 min sur glace avec du RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) 1X (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5), 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxycholate de sodium, 0,1% SDS, et avec le cocktail complet d'inhibiteur de protéases (*Roche*). Le lysat cellulaire fut débarrassé des débris par une centrifugation de 13 000 x g durant 20 minutes à 4°C. La quantification protéique a été faite avec le réactif de Bradford avec une détection se faisant à $\lambda = 595\text{nm}$. 30 μg de protéines ont été déposés sur gel. Les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes en présence de Laemmli 6X avant d'être déposés sur gel. Les bW (buvardage par western) ont été faits avec des gels SDS-PAGE 8% polyacrylamide. La migration a duré une heure à 25 mA/gel. Les protéines ont été transférées toute la nuit dans un tampon de transfert contenant 20% de méthanol sur des membranes de nitrocellulose (*Biorad*). Le blocage s'est fait dans une solution de TBS-T avec 5% lait à la température de la pièce pendant une heure. Les membranes incubées avec l'anticorps anti-HA conjugué à la HRP (1/1000) (*Roche*) ainsi que les membranes incubées avec l'anti-Fc de souris conjugué à la HRP (1/500) (*Amersham*) ont été incubées deux heures à la température pièce. La révélation des membranes s'est faite avec le kit ECL-Plus (*Amersham*) comme le manuel l'indiquait. Les films utilisés pour l'exposition sont les Hyperfilm (*Amersham*).

2.5 Biosynthèse des protéines de fusion SN11CT-FL-ACE₂ et SN11 CT-FL-ACE₂ V/A.

Après deux heures post-transfection, les cellules ont été lavées et incubées pendant un temps variable soit avec 250 $\mu\text{Ci/ml}$ Met/Cys ou 400 $\mu\text{Ci/ml}$ Na₂ [³⁵S] SO₄ (PerkinElmer Life Sciences). Les cellules ont été lysées avec du tampon RIPA. Le lysat cellulaire a été par la suite immunoprécipité, soit avec l'anti-HA couplé aux billes d'agarose ou avec la protéine A/G agarose (*Santa Cruz*). Les billes furent lavées quatre

fois avec le RIPA 1X, puis une fois au PBS 1X. L'immunoprécipité fut détaché des billes par une incubation de 5 minutes dans le Laemmli 2X (100mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 12% glycérol). Les protéines de l'immunoprécipité ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 8% Tricine. Ces gels furent par la suite traités 45 min dans une solution de 40% méthanol, 10% acide acétique, 50% eau, puis 45 min dans la solution Amplify (Amersham). Ils furent séchés par après 2h à 80°C dans un appareil *Biorad Gel Dryer* modèle 583. Nous avons utilisé des films X-OMAT (*Kodak*) ou Biomax (*Kodak*) pour les expositions de 20h à -80°C.

Résultats

Chapitre III: Résultats

3.1 Présentation des constructions Fc-ACE₂-Fusion utilisées

Comme mentionnée auparavant, la construction Fc-ACE₂-Fusion est composée de quatre éléments distincts; soit l'épitope HA, d'un corps Fc et de la queue cytoplasmique d'ACE₂, dont le transmembranaire y est inclus et d'une séquence variable, servant à cibler la PC voulue (**Figure 12**). Pour comprendre le fonctionnement de cette construction, il faut définir le rôle de ses éléments. L'épitope HA sert essentiellement de moyen de détection de la construction sous différentes conditions dans différentes expériences. Le corps Fc stabilise la protéine de fusion. De plus, comme le HA, la partie Fc sert aussi de moyen de détection nous indiquant le niveau d'expression de la construction dans la cellule. Le transmembranaire d'ACE₂ permet l'incrustation de la protéine de fusion dans la membrane plasmique permettant sa détection à la surface cellulaire. Ceci s'avère utile dans les expériences d'CELISA (*cell enzyme linked immunosorbent assay*). Finalement, la séquence variable est une séquence d'acides aminés qui doit être reconnue par une PC afin que celle-ci puisse la cliver. Puisque l'épitope HA coiffe la séquence variable, si cette dernière est clivée, la construction finale perd son HA. Donc, plus les constructions synthétisées seront clivées, moins on détectera le HA. Cependant, qu'il y ait clivage ou non, la partie Fc reste. Donc, cette partie nous indiquera la totalité des constructions synthétisées par la cellule. Ainsi, nous pourrions comparer l'efficacité de clivage des séquences utilisées en observant la variation de détection du signal HA à celui du Fc. Une séquence parfaitement clivée ne montrera aucun signal HA, mais un signal Fc quelconque dépendamment du niveau d'expression de la construction. Par contre, le contraire démontrera une équivalence de signal entre les signaux HA et Fc. La maturation du Fc de la construction, par la glycosylation, nous permettra aussi d'estimer où et quand se fait le clivage de la séquence en regardant le signal HA dépendamment de l'expérience effectuée. L'utilité de ces paramètres nous permet d'évaluer l'efficacité d'un inhibiteur sur le clivage de la construction. Un inhibiteur parfait, empêche la PC de cliver la construction. Ceci ravivera l'intensité du signal HA à celui du Fc tout en sachant où et quand se fait l'inhibition.

Les constructions contrôles utilisées dans ce projet sont nommées *VII60* et *VII79*. *VII60* est un vecteur d'expression *pcDNA₃* codant pour la protéine de fusion Fc-ACE₂-Fusion, avec une séquence variable reconnue par PC1/3 et PC5/6 et avec seulement le transmembranaire de ACE₂ dans sa partie C-terminale. Les expériences dans notre laboratoire ont démontré qu'elle n'était presque pas clivée par ces PC. C'est pour cela qu'elle nous sert de contrôle négatif. *VII79* est la même chose que *VII60*, mais avec une séquence pour la Furine. La séquence utilisée dans ce cas est : KRIRLRR↓SPD. Celle-ci a démontré une grande efficacité de clivage par la Furine et une bonne réponse lors de l'utilisation d'inhibiteur de convertases (voir les prochaines expériences). C'est pour cela qu'elle est utilisée comme contrôle positif dans nos expériences.

Pour la séquence de PCSK9, la séquence utilisée est celle correspondant à son prosegment soit : SSVFAQSIP, nommé *pcDNA₃ FC-ACE₂-Fusion NARC SP9* ou simplement *SP9*. *SP9*, dû au fait qu'elle commence par une sérine (S) et qu'elle finit par une proline (P) et qu'en tout, elle est composée de neuf (9) acides aminés. La deuxième séquence utilisée est SSVFAQSIPWN, soit *SN11*. La *SN11* a été conçue pour améliorer la reconnaissance de la construction par la PCSK9. Ces premières constructions sont des variantes de *VII60*, soit avec seulement le transmembranaire d'ACE₂. Durant le projet, nous avons complété le transmembranaire en rajoutant le restant de la queue C-terminale d'ACE₂. En plus de contenir la partie transmembranaire et la partie cytosolique, la queue complète d'ACE₂ comporte deux motifs de type NPXY et YXXΦ permettant à la protéine de fusion d'aller davantage vers la surface cellulaire et d'être endocytée afin d'être dégradée (11). De cette manière, la construction se comporte plus naturellement et a plus de chance de rencontrer PCSK9 et d'être clivée. De là, la *SN11* est devenue *SN11 CT-FL-ACE₂* (CT= C-terminal et FL=Full length). Vers la fin du projet, nous voulions tester la spécificité du clivage de la construction pour la PCSK9. Une mutation de la Valine en Alanine a été effectuée dans la séquence SSVFAQSIPWN donnant finalement la séquence SSAFAQSIPWN. Celle-ci correspond à une mutation du prosegment de PCSK9 qui la rend incapable de cliver son prosegment et de s'autoactiver. De là a été créé *SN11CT-FL-ACE₂ V/A (64)* (**Figure 12**).

ACE₂ = Angiotensine Converting Enzyme 2
 TM-ACE₂ = Le transmembranaire de ACE₂
 CT-FL-ACE₂ = La queue complète C-terminale d'ACE₂

46

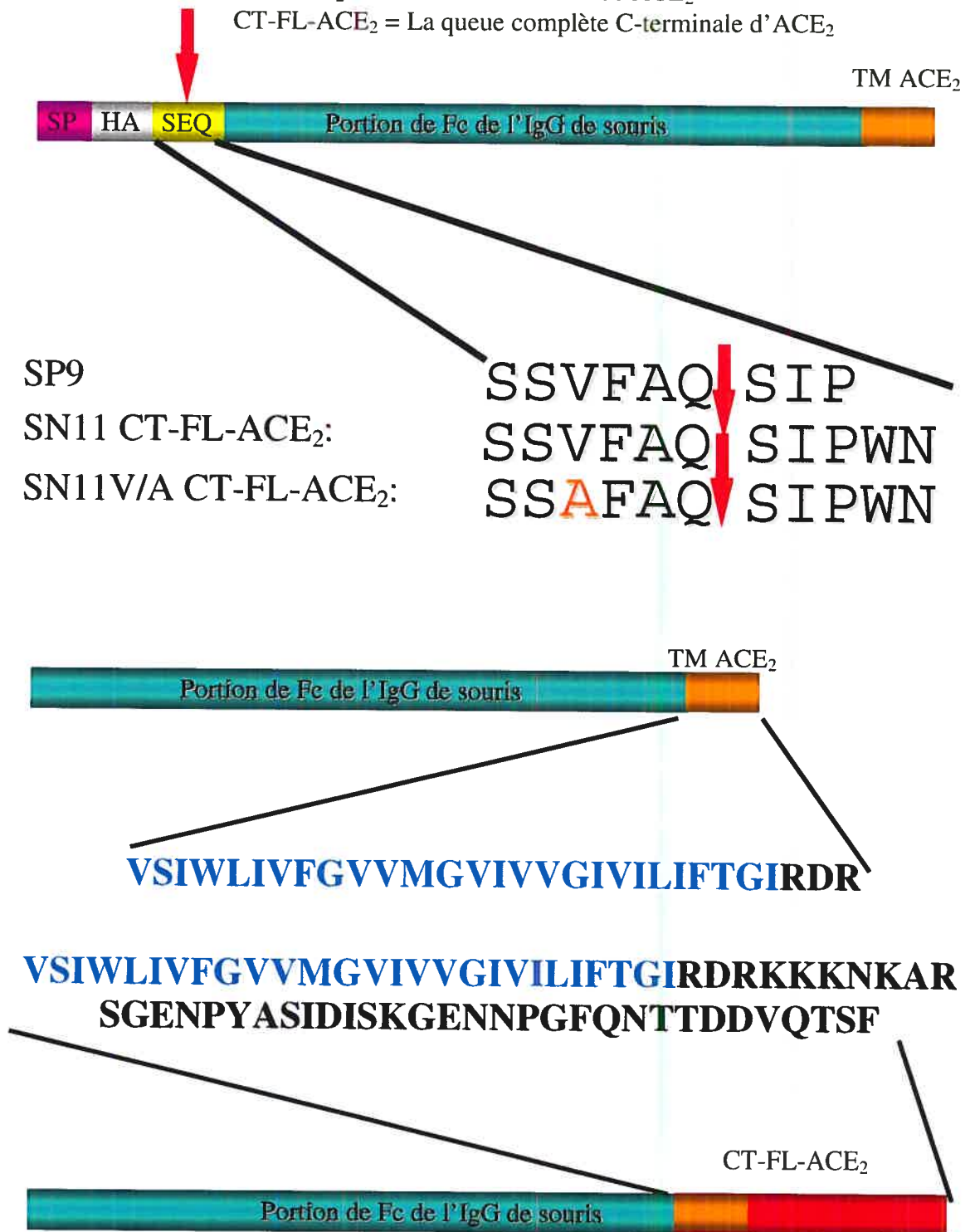
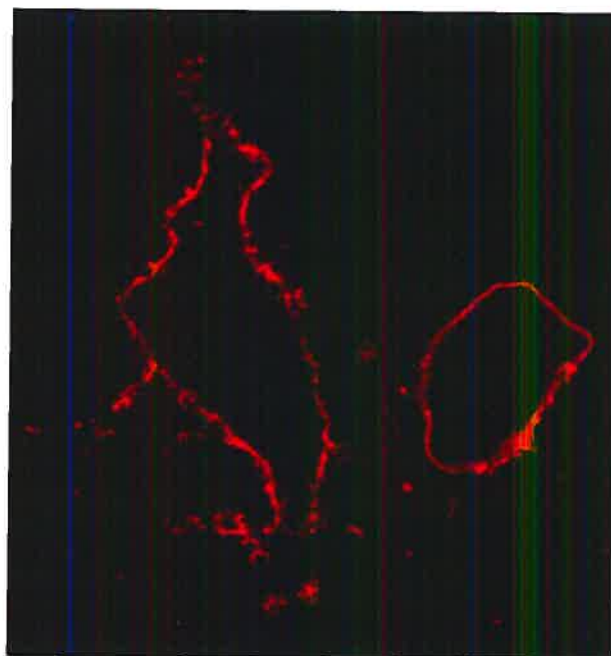


Figure 12: Constructions utilisées pour détecter de l'activité enzymatique de PCSK9

La séquence utilisée au départ, dans notre protéine de fusion, afin de cibler PCSK9, fut la séquence de son prosegment soit : SSVFAQSIP. Par la suite nous avons allongé la séquence, pour donner SSVFAQSIPWN, pour améliorer la reconnaissance de la construction par PCSK9. La séquence SSAFAQSIPWN fut créé afin d'avoir un contrôle négatif spécifique à PCSK9. La queue complète C-terminale d'ACE₂, contenant le transmembranaire, fut rajoutée pour augmenter la sortie de la construction du RE, afin d'aller davantage à la surface cellulaire.

3.2 Caractérisation de la construction FC-ACE₂-Fusion

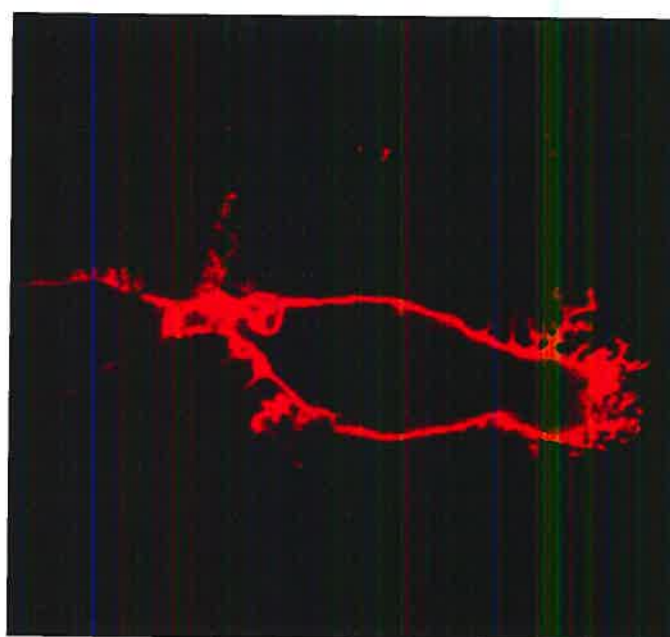
La construction FC-ACE₂-Fusion est une protéine de fusion au comportement intracellulaire encore indéfinie. Nous avons dans un premier temps voulu vérifier plusieurs aspects de cette construction comme son niveau d'expression. Une des choses primordiales était qu'elle devait entrer efficacement dans la voie sécrétoire afin qu'elle puisse cibler PCSK9 sans pour autant être dégradée. Enfin, elle devait atteindre la surface cellulaire afin qu'elle puisse nous indiquer, dans un test colorimétrique, si elle perdait son épitope HA dû au clivage de sa séquence SSVFAQSIP/WN par PCSK9. Nous avons utilisé cette séquence, car elle correspondait au site de clivage du prosegment de PCSK9. Dans ce cas, nous avons considéré la PCSK9 comme les autres PCs, c'est-à-dire que la séquence de clivage de son substrat est le même ou semblable à celui de son prosegment. Nous espérions que cette construction agisse à titre de substrat de PCSK9. La construction VII79, ayant une séquence reconnue par la Furine et ayant seulement le transmembranaire de ACE₂, a été utilisée comme contrôle positif. Des expériences ultérieures ont démontré que cette construction est bel et bien exprimée et tout aussi bien clivée par la Furine.



Anti-Fc

Figure 13 : Immunofluorescence de *SN11* dans cellules HuH7

Nous avons fait l'immunofluorescence en condition non-perméabilisante avec l'anticorps anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) de la *SN11* transfectée dans cellules HuH7.



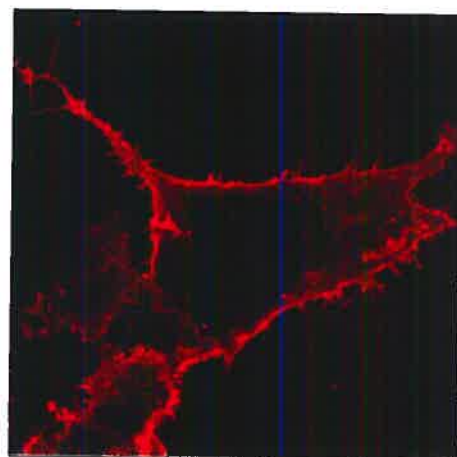
Anti-Fc

Figure 14 : Immunofluorescence de *SN11CT-FL-ACE2* dans les cellules HuH7

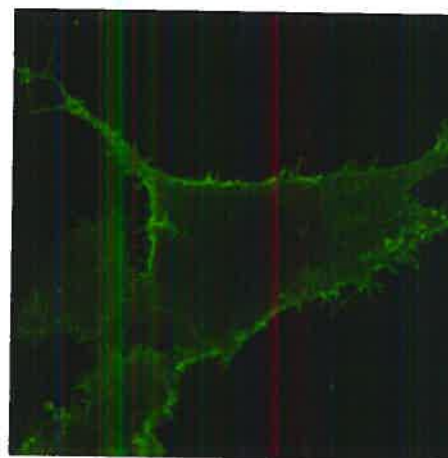
Nous avons fait l'immunofluorescence en condition non-perméabilisante avec l'anticorps anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) de la construction *SN11CT-FL-ACE2* transfectée dans cellules HuH7.

Dans un premier temps, nous avons fait l'analyse par immunofluorescence en condition non-perméabilisantes, des constructions *SN11* et *SN11CT-FL-ACE₂* transfectées dans des cellules HuH7. L'anticorps utilisé fut l'anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) (**Figures 13 et 14**). L'utilisation de l'anticorps anti-Fc nous permet d'observer la totalité des constructions arrivées à la surface cellulaire même si ceux-ci ont perdu leur épitope HA suite au clivage, s'il y a lieu. De plus, nous avons utilisé les cellules HuH7 parce qu'elles proviennent du foie, organe où il a été démontré qu'il y avait une forte expression de PCSK9 et du LDL-R (65). Finalement, elles ont l'avantage d'être facilement transfectable à la Lipofectamine 2000 et elles sont faciles à manipuler lors des cultures cellulaires. Comme on l'observe aux **Figures 13 et 14**, on remarque que la construction ayant la queue complète d'ACE₂ (*SN11CT-FL-ACE₂*) (**Figure 13**) est majoritairement présente à la surface cellulaire comparativement à l'autre qui n'a que le transmembranaire (**Figure 14**). A noter la discontinuité qu'il y a du marquage d'une figure à l'autre. On peut penser que la queue complète d'ACE₂ aide à un meilleur trafic de la construction vers la surface cellulaire, mais aussi à un meilleur recyclage de la construction dû aux motifs d'endocytose, vers les endosomes tardifs, NPXY et YXXΦ (11). Ensuite, ceci confirme du même coup que la construction a des chances de rencontrer PCSK9 puis qu'elle va à la surface cellulaire en passant par la voie sécrétoire. Enfin, on voit que le corps Fc stabilise la construction en empêchant sa dégradation. Ceci est facilement constaté, puisque la construction est détectable par l'anticorps anti-Fc. Une autre série d'immunofluorescences, avec les constructions *SN11CT-FL-ACE₂* et *VII79* dans les cellules HuH7 furent effectuées. Cette fois, nous avons utilisé les anticorps anti-Fc et anti-HA complexé à Alexa 488 (couleur verte), autant dans les conditions perméabilisantes et non-perméabilisantes (**Figures 15, 16 et 17**). La révélation anti-HA nous montre les constructions qui ont échappé au clivage. On déduit que l'épitope HA est assez résistant à la dégradation puisque plusieurs constructions l'ont conservé. Ces résultats nous laissaient espérer à un clivage spécifique de la construction par PCSK9. La détection de *VII79* (**Figure 15**) démontre une moins grande population à la surface cellulaire due au transmembranaire d'ACE₂ seulement. Chose intéressante, on remarque que l'image montrant la superposition des deux marquages, pour la *VII79*, montre une tendance au marquage rouge plutôt que

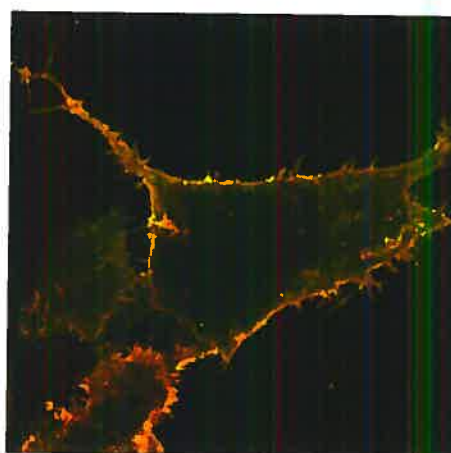
jaune. Ceci nous permet de supposer que cette construction est plus fortement clivée que les *SN11CT-FL-ACE₂* montrant un marquage penchant vers le jaune (**Figures 16 et 17**), suggérant moins de clivage. De plus, ceci est encore plus accentué à la **Figure 17** où la superposition des deux marquages, en conditions perméabilisantes, tend plus vers le vert, voulant dire presque aucune perte de l'épitope HA.



Anti-Fc



Anti-HA



Combinaison des deux marquages

Figure 15 : Immunofluorescence double de VII79 (CTR+) dans les cellules HuH7

Nous avons fait l'immunofluorescence en condition non-perméabilisante avec l'anticorps anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) et anti-HA complexé à Alexa 488 (couleur vert) de la construction *VII79* transfectée dans cellules HuH7.

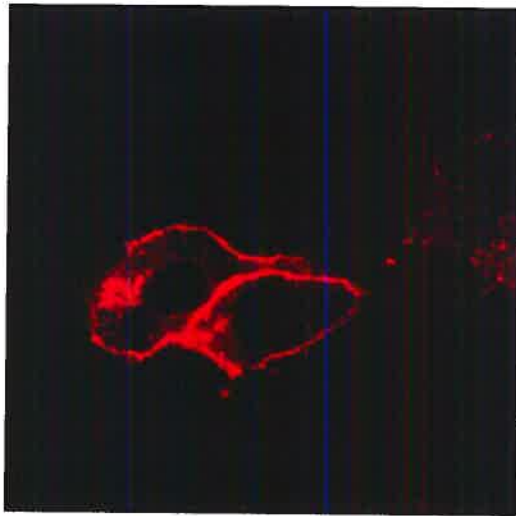
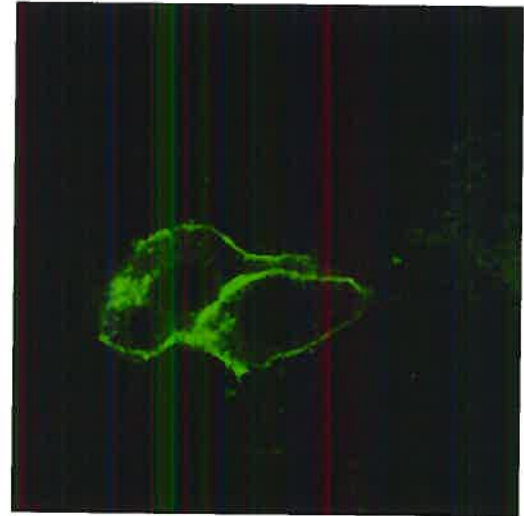
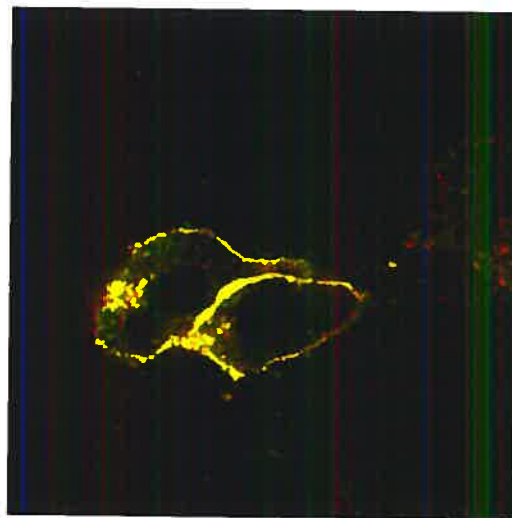
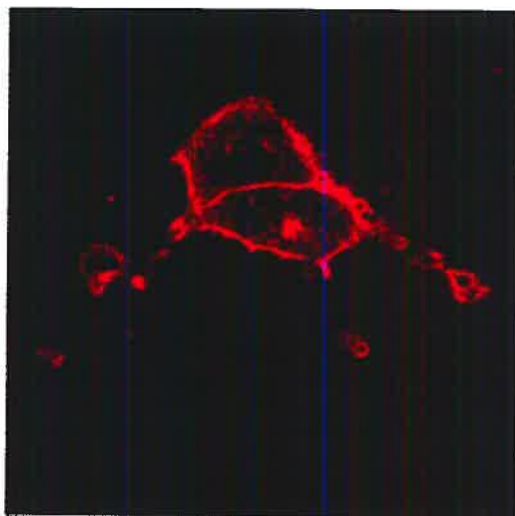
Condition non perméabilisante**Anti-Fc****Anti-HA****Combinaison des deux marquages**

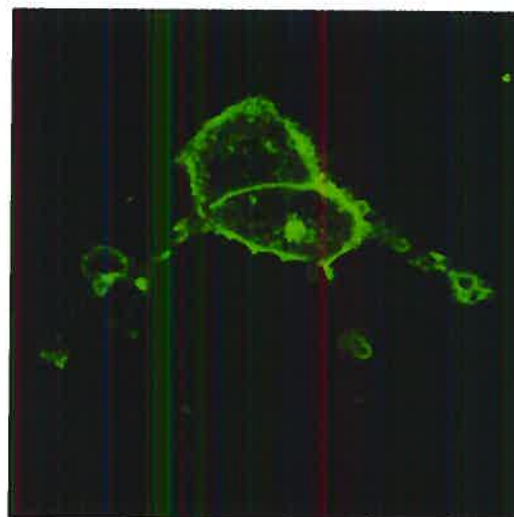
Figure 16 : Immunofluorescence double de *SN11CT-FL-ACE₂* en condition non- perméabilisante dans les cellules HuH7

Nous avons fait l'immunofluorescence en condition non-perméabilisante avec l'anticorps anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) et anti-HA complexé à Alexa 488 (couleur vert) de la construction *SN11CT-FL-ACE₂* transfectée dans cellules HuH7

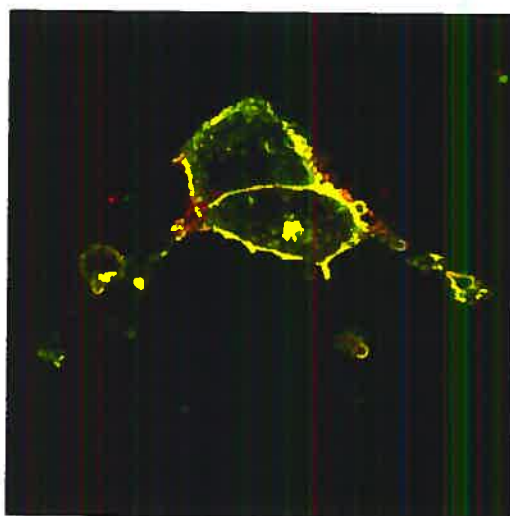
Condition perméabilisante



Anti-Fc



Anti-HA



Combinaison des deux marquages

Figure 17 : Immunofluorescence double de *SN11CT-FL-ACE₂* en condition perméabilisant dans les cellules HuH7

Immunofluorescence en condition perméabilisante avec l'anticorps anti-Fc de souris complexé à Alexa 555 (couleur rouge) et anti-HA complexé à Alexa 488 (couleur vert) de la construction *SN11CT-FL-ACE₂* transfectée dans cellules HuH7.

Nous avons abordé la question de l'expression de la protéine cette fois en faisant un bW. L'avantage dans ce cas, est que l'on détecte plus précisément le clivage, sur la totalité des chimères produites et non juste sur celles qui ont été marquées par les anticorps fluorescents. Le bW des HuH7 à la **Figure 18** nous montre deux bandes sauf pour VII79 où il n'y en a qu'une. Les bandes du bas (bande A) représentent les protéines non matures du RE. Ces protéines immatures représentent les formes non glycosylées de la partie Fc de la construction. Nous savons que les chaînes lourdes des anticorps subissent la glycosylation dans le Golgi (79). Ceci mène à un poids moléculaire plus grand créant ainsi la deuxième bande (bande B). Le bW fait avec l'anticorps anti-HA nous montre la totalité des constructions qui n'ont pas été clivées. Il faut aussi observer que les bandes A et B de *SN11CT-FL-ACE₂* ont un poids moléculaire plus grand dû à la plus longue queue d'*ACE₂*. On remarque aussi que la construction VII79 (CTR+), ciblant la Furine, est efficace car aucune bande golgienne n'apparaît contrairement aux autres. C'est ce dont on s'attendait. Un test de q-PCR, fait dans notre laboratoire, a démontré que les cellules HuH7 étaient la lignée cellulaire hépatique ayant la plus grande expression de la Furine. De plus, ceci nous indique que la Furine est active dans ces cellules. Ceci explique pourquoi les chimères VII79 qui ont atteint le Golgi ont été clivées par la Furine menant à une perte de leurs épitope HA. Nous remarquons que la construction ayant le SIP (*SP9*) dans sa séquence variable au lieu du SIPWN (*SN11* et *SN11CT-FL-ACE₂*) est moins clivée que cette dernière. Il se peut que l'allongement de la séquence jusqu'à WN soit mieux reconnu par PCSK9 expliquant ainsi un plus grand clivage et du même coup une plus grande perte du signal HA. Finalement, la construction *SN11CT-FL-ACE₂* nous montre qu'elle sort mieux du RE que les autres due à sa queue complète d'*ACE₂*. Le contrôle négatif VII60 ne démontre pas de coupure dû au fait que la bande golgienne n'a pas diminuée d'intensité. Fait important à savoir, aucune surexpression de PCSK9 n'a été faite dans ces premières expériences. On voulait savoir en premier lieu si la PCSK9 endogène pouvait avoir un effet sur le clivage ou si d'autres enzymes possibles pouvaient participer à ce clivage. Nous savons que la chimère aurait un potentiel d'être clivé par la PCSK9 dû à sa séquence, mais aussi au trafic qu'elle utilise.

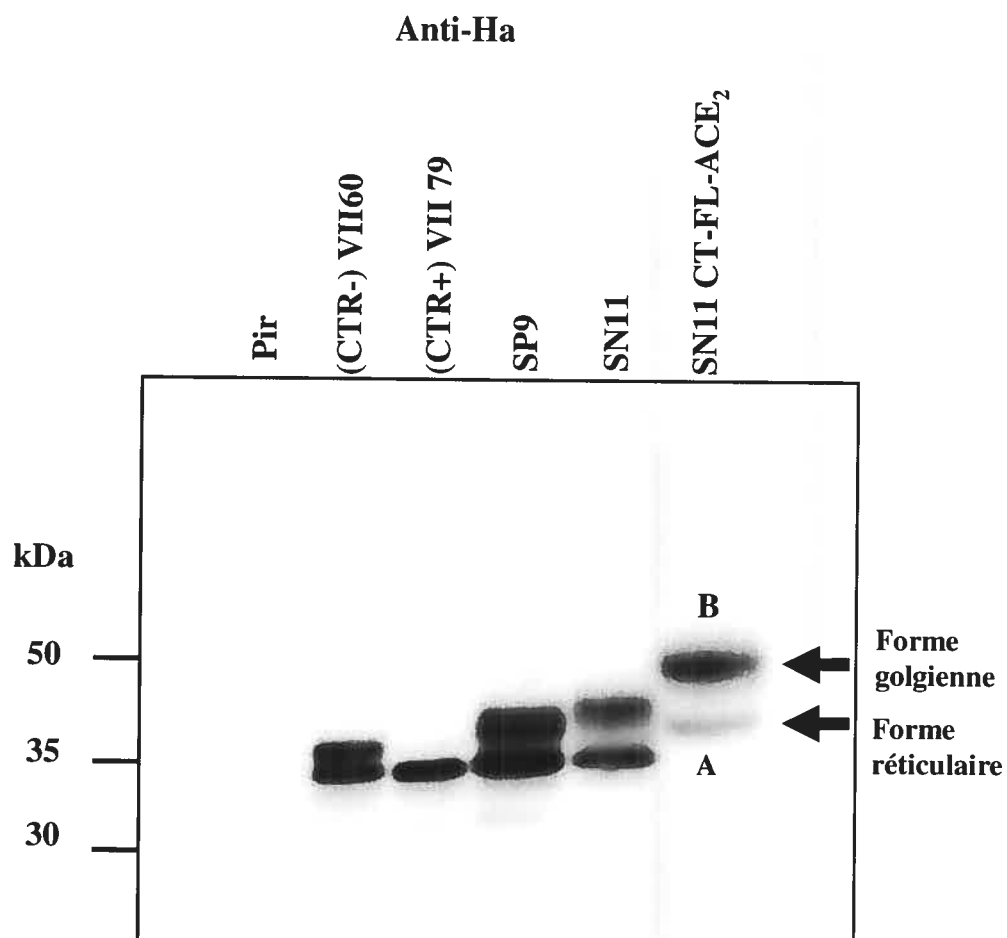


Figure 18: Immunobuvardage anti-HA HRP des constructions PCSK9

Les cellules HuH7 furent transfectées transitoirement avec le vecteur vide *pIRES* (Pir), les constructions *VII60* (CTR-), *VII79* (CTR+), *SP9*, *SN11* et *SN11CT-FL-ACE₂*. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP. Les bandes **A** sont les bandes immatures non glycosylées en Fc du RE. Les bandes **B** représentent les constructions matures glycosylées du Golgi.

3.3 Amélioration du clivage de la construction.

Nous voulions améliorer le clivage en augmentant possiblement l'activité enzymatique de PCSK9 en nous basant sur son potentiel à dégrader le LDL-R. La seule activité de PCSK9 que l'on peut détecter est celle qui mène à une baisse du LDL-R lors de l'expression de la convertase. Pour arriver à une amélioration, nous avons dans un premier temps, voulu diminuer l'effet de la Furine sur cette convertase. *Benjannet S et al 2006* ont démontré que la Furine participait à la régulation de PCSK9 en la clivant dans son site catalytique. Donc, en inhibant la Furine, nous avons peut-être une chance d'augmenter l'activité de PCSK9. Dernièrement il a été démontré dans *Nassoury N et al 2006* (données non publiées) qu'il y avait une colocalisation de PCSK9 et du LDL-R dans les compartiments acides, comme les endosomes tardifs ou les lysosomes, lorsqu'ils sont co-exprimés. Elle démontre en effet que, dans les cellules déficientes en LDL-R, la PCSK9 endogène se retrouve partout dans la voie sécrétoire. L'addition du LDL-R, par surexpression, dans ces cellules, dirige PCSK9 dans ces compartiments chez ces cellules. Enfin, l'addition de NH_4Cl dans les HuH7 augmentait aussi la détection des deux protéines dans ces compartiments. Le NH_4Cl a la propriété d'augmenter le pH des endosomes, pouvant mener à une inhibition des enzymes protéolytiques de ces compartiments. Ceci explique l'augmentation du LDL-R et de PCSK9 dans ces compartiments. De plus, le NH_4Cl affecte l'endocytose des protéines de la surface cellulaire (80). Ceci est expliqué par le fait qu'après plusieurs heures de traitement au NH_4Cl , l'inhibition de l'hydrolyse lysosomale, par l'augmentation du pH, ralentit le processus d'endocytose parce que le compartiment lysosomal devient saturé avec les LDL-R et ses ligands. Cet engorgement lysosomal fait en sorte que la voie endosomale stagne avec des LDL-R non dégradés dans la cellule. Si le LDL-R est moins dégradé, il sera moins internalisé. Enfin, *Maxwell et al 2005* ont même démontré que l'effet de PCSK9 sur le LDL-Rs n'était pas affecté par des inhibiteurs du protéasome (73). Tout ceci nous a amenés à penser que l'activité de PCSK9 devait être dans des compartiments à pH acides. L'utilisation du NH_4Cl devrait donc diminuer le clivage des chimères ciblant PCSK9, en diminuant leur endocytose (surtout celle ayant la queue complète d'ACE₂) et en diminuant l'activité de PCSK9 par l'augmentation du pH.

Dans les prochaines expériences, deux bW ont été faits avec les mêmes échantillons, mais révélés cette fois avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP. Ce dernier a la propriété de nous montrer la totalité des constructions produites dans la cellule avec ou sans l'épitope HA. En combinant ces deux résultats, on peut savoir s'il y a eu clivage ou non. Si l'intensité de la révélation anti-Fc est égale à celui du HA, cela veut dire que toute construction produite n'a pas subi de clivages, ne perdant pas ainsi son épitope HA. Au contraire, si l'intensité de l'anti-HA est inférieure à celui du Fc, nous pourrions conclure qu'il y a eu clivage puisque qu'il y a eu perte de l'épitope HA seulement. Des tests d'exposition ont été effectués avec les deux anticorps aux mêmes doses protéiques afin que la contrainte de l'affinité des anticorps pour leur antigène ne soit pas un obstacle à l'interprétation des résultats.

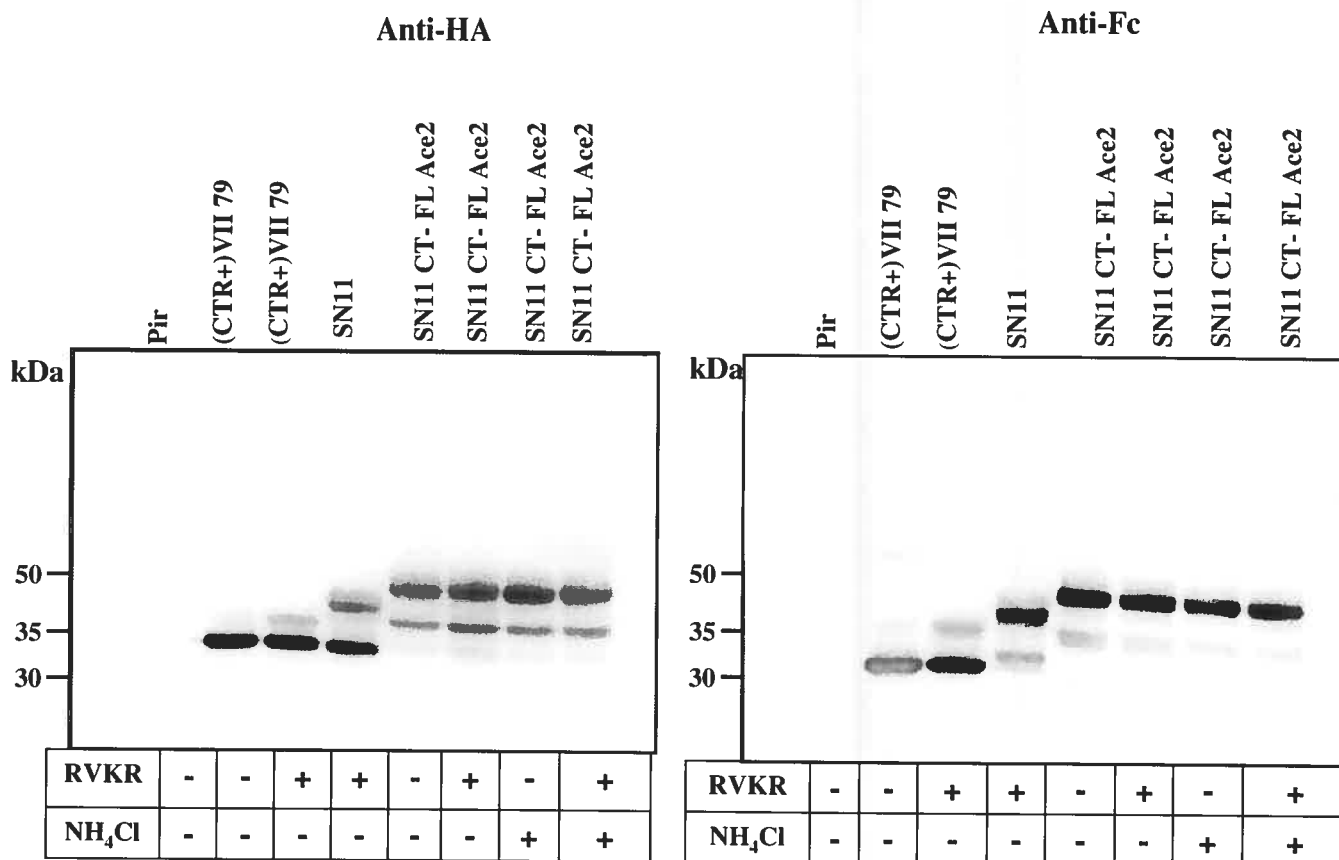


Figure 19 : Effet du clivage des constructions PCSK9 dans les cellules HuH7

Les cellules HuH7 furent transfectées transitoirement avec le vecteur vide pIRES₂(Pir), les constructions VII79 (CTR+), SN11 et SN11/CT-FL-ACE₂ avec ou sans 50uM de dec-RVKR-cmk ou 10mM NH₄Cl. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP.

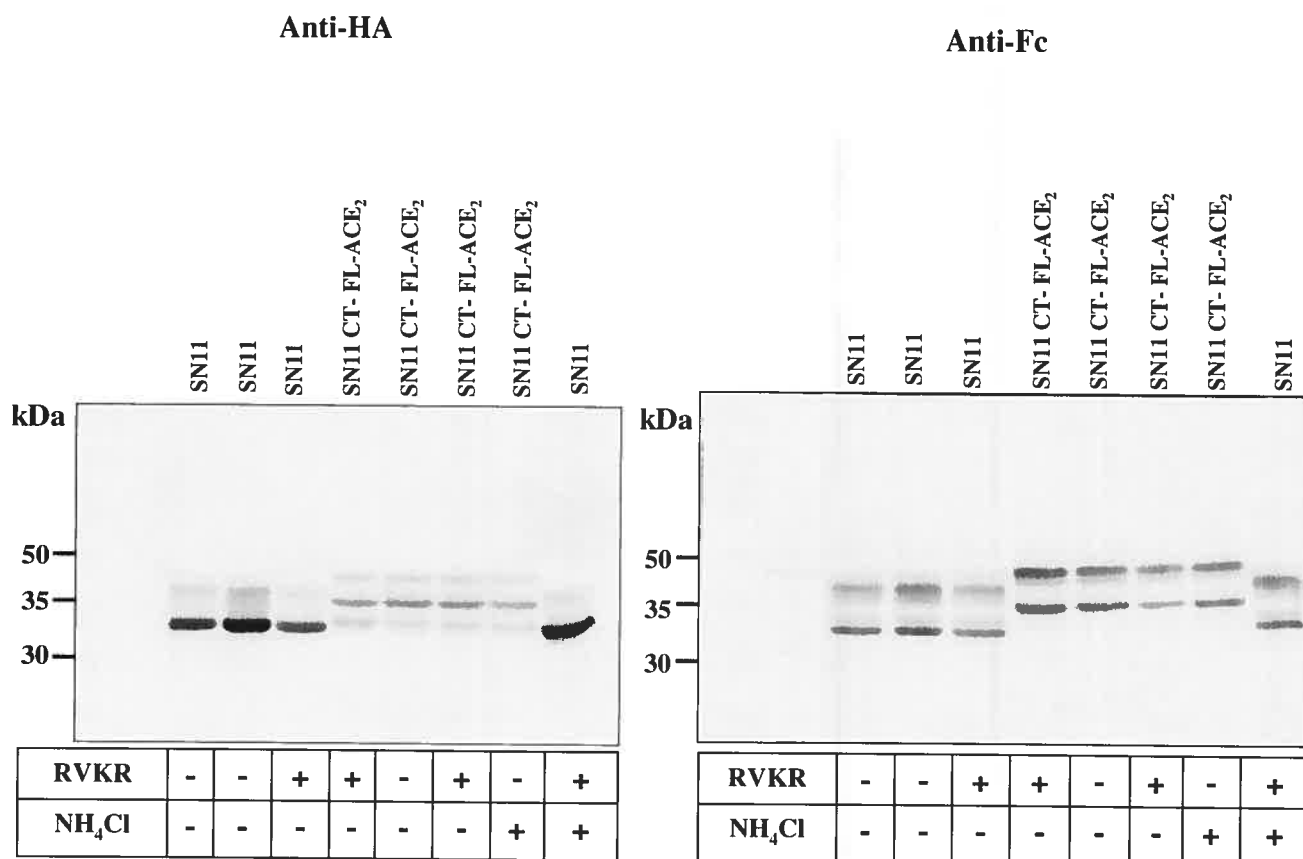


Figure 20 : Effet du clivage des constructions PCSK9 dans les cellules HepG2

Les cellules HepG2 furent transfectées transitoirement avec les constructions *SN11*, et *SN11CT-FL-ACE₂* avec ou sans 50uM de décanoyl-RVKR-cmk ou 10mM NH₄Cl. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP.

On remarque que l'inhibition de la Furine par l'utilisation du décanoyl-RVKR-CMK n'a pas affecté le clivage des constructions *SN11* et *SN11CT-FL-ACE₂* dans les HuH7 (**Figure 19**). De plus, le NH₄Cl n'a pas plus diminué le clivage. L'effet le plus notable est celui de la construction pour la Furine où l'on voit une augmentation du

signal HA en présence du décanoyl-RVCR-CMK. Nous avons pensé refaire la même expérience, cette fois dans les cellules HepG2, une autre lignée cellulaire hépatique dont l'expression de la Furine est inférieure à celle d'HuH7 (démontrée par q-PCR en laboratoire) mais plus difficile à transfecter. Ce critère devrait augmenter nos chances d'observer le clivage potentiel de PCSK9 dû à la plus basse expression de la Furine dans cette lignée. Or, comme on le voit à la **Figure 20**, on remarque que le décanoyl-RVCR-CMK ainsi que le NH_4Cl n'ont aucun effet substantiel sur le clivage. Mais dans les deux expériences le signal anti-HA est toujours inférieur à celui du Fc. Chose intéressante, le signal anti-HA est encore plus réduit pour les bandes golgiennes (bande B) dans les HepG2 que dans les HuH7. Ceci est favorable, car il a été démontré que la dégradation du LDL-R par PCSK9 est plus considérable dans les HepG2 que dans les HuH7 (78).

Pour savoir si PCSK9 pouvait être la cause de ces clivages, nous avons décidé de cotransfecter notre construction *SN11CT-FL-ACE₂* avec la PCSK9 wt (*wild type*) ou la PCSK9 H226A dans les cellules HEK293. Ce mutant donne une PCSK9 inactive dû au fait qu'elle est incapable de s'autoactiver. Ceci mène à sa séquestration dans le RE (64). Dans toutes les autres expériences, nous avons observé du clivage dans les conditions où l'expression de PCSK9 était endogène. Dans ce cas, on voulait savoir si la surexpression de cette convertase allait augmenter le clivage. Une des raisons qui nous a poussé à faire cette expérience est que la dégradation du LDL-R endogène ne se fait que lorsqu'il y a une surexpression de PCSK9 dans les cellules HepG2 et HuH7 (64). Comme on le voit à la **Figure 21**, on voit premièrement que la Furine ainsi que les protéines intracellulaires des HEK293 n'affectent en aucun cas le clivage de la construction puisque les patrons du bW anti-Fc sont les mêmes que ceux de l'anti-HA. Cependant, dans le cas où la PCSK9 wt ou la PCSK9 H226A a été ajoutée, on voit que le patron n'est plus le même. L'ajout de PCSK9 wt diminue grandement l'intensité des bandes A et B comparativement à l'ajout de PCSK9 H226A dans le bW anti-HA. Le bW anti-Fc nous indique que l'expression de la construction a aussi diminué lors de l'ajout de PCSK9 wt comparativement à PCSK9 H226A. Ceci explique alors cette diminution dans le bW anti-HA dans ces deux conditions. Ceci porte à croire que le choix de la cellule HEK 293 n'est pas optimal, car même dans la condition où la construction est seule, aucun clivage n'est obtenu. La surexpression d'une PCSK9

active n'a eu aucun effet, alors qu'on sait que dans des cellules où la PCSK9 est exprimée d'une manière endogène, il y a présence de clivage. Ceci restreint nos futures expériences aux deux lignées cellulaires hépatiques HepG2 et HuH7.

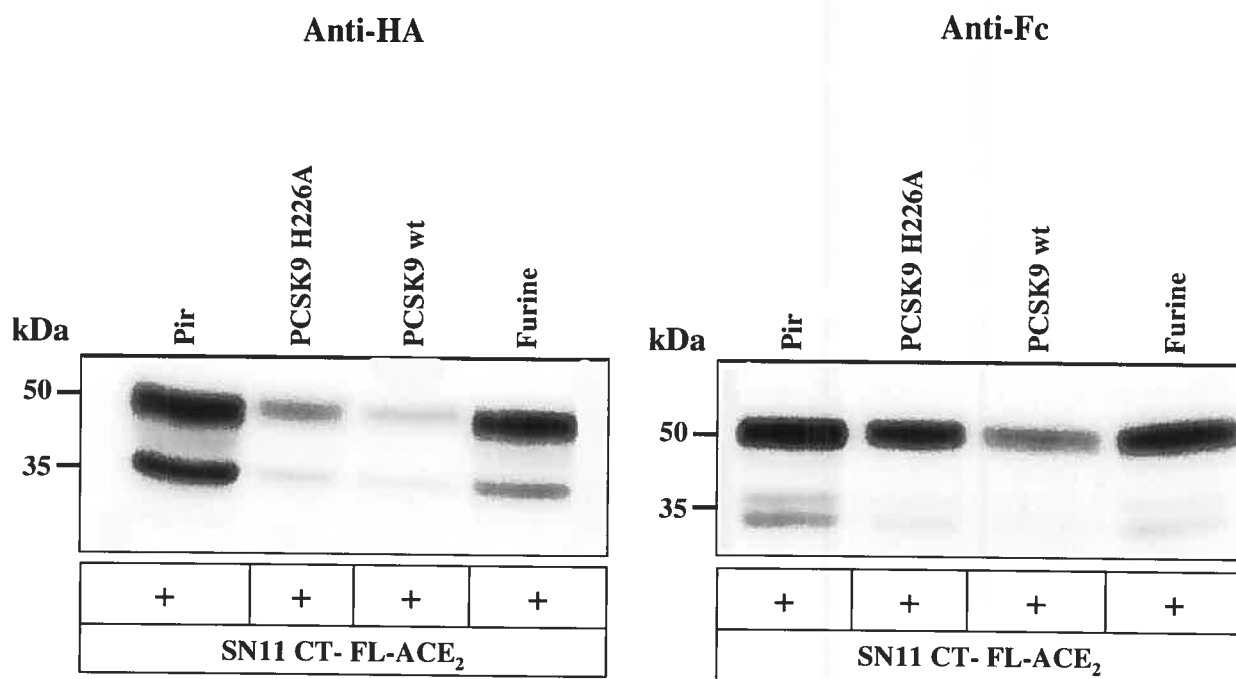


Figure 21 : Effet du clivage de *SN11CT-FL-ACE₂* lors de la surexpression de PCSK9 dans les HEK 293

Les cellules HEK293 furent transfectées transitoirement avec 50% d'ADNc des constructions *SN11CT-FL-ACE₂* et 50% du vecteur vide Pires, de l'ADNc de PCSK9 wt, PCSK9 H226A et de l'ADNc de Furine. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP.

3.4 Démonstration du clivage par PCSK9

Cette série d'expériences tente de démontrer que finalement le clivage perçu dans les cellules HuH7 et HepG2 est véritablement fait par la PCSK9. Pour le démontrer, nous avons repris les constructions précédentes et nous avons changé la séquence variable pour SSAFAQSIPWN. Nous avons repris la mutation de la Valine en Alanine de l'article de *Benjannet S, et al 2004*. Ceux-ci ont démontré que la mutation de la Valine 149 en Alanine dans le prosegment de PCSK9 avait pour conséquence que la proPCSK9 ne s'autoclivait pas pour donner la PCSK9 active et n'était pas sécrétée dans le milieu. En sachant cela, on s'était dit que si le mutant V→A était clivé, le clivage ne pouvait pas être dû à PCSK9. Nous avons commencé par faire une expérience dans les HuH7 avec les constructions *SN11CT-FL-ACE₂* et *SN11 CT-FL-ACE₂ V/A* en cotransfection dans un rapport 1 pour 3 de l'une ou de l'autre des constructions, pour 3 parties des différentes constructions de PCSK9 faites au laboratoire. Ces constructions sont : PCSK9 wt, PCSK9 avec le *CT-FL* d'ACE₂, de Lamp1 ou du LDL-R et PCSK9 avec RRRR EL dans son site actif. Ce dernier est extrêmement sensible au clivage par la Furine. Au laboratoire, les constructions PCSK9 avec les queues C-terminales d'ACE₂, de Lamp1 et du LDL-R ont démontré une plus grande facilité à dégrader le LDL-R que la PCSK9 wt (données non publiées). Ces queues C terminales ainsi que les domaines transmembranaires ont la propriété de diriger davantage la convertase dans les compartiments acides dû aux différents motifs d'endocytose du type NPXY et YXXΦ des différentes queues ajoutées. Ceci mène à une possible activité de l'enzyme pour la dégradation du LDL-R. De plus, le rapport 1 pour 3 nous permet d'augmenter nos chances d'avoir du clivage dû à la moins grande expression de la construction. La **Figure 22** nous montre le résultat dans les HuH7. On s'attend à ce que les transfections transitoires faites avec les PCSK9-ACE₂, Lamp1 ou LDL-R donnent un plus grand clivage qu'avec la PCSK9 wt. La construction avec la mutation V/A devrait être plus résistante au clivage pour toutes les constructions PCSK9. En comparant les gels anti-Fc avec les anti-HA, on voit qu'il y a bel et bien une diminution de l'intensité du HA avec les constructions *SN11CT-FL-ACE₂* cotransfectées avec les différentes PCSK9 malgré la constance du signal anti-Fc. De plus, on s'attend à ce que la PCSK9 RRRR EL ne cause pas de clivage. C'est ce que l'on voit dans ce cas avec un regain d'intensité du signal HA dans cette condition. La PCSK9 wt n'affecte pas le clivage de la

construction, puisque c'est à cette condition qu'il y a la plus grande intensité de l'épitope HA. Pour ce qui est des constructions V/A, on voit que la variation du HA est proportionnelle à celle du FC; voulant dire ainsi que rien n'a affecté cette construction, pas même les différentes PCSK9 cotransfectées.

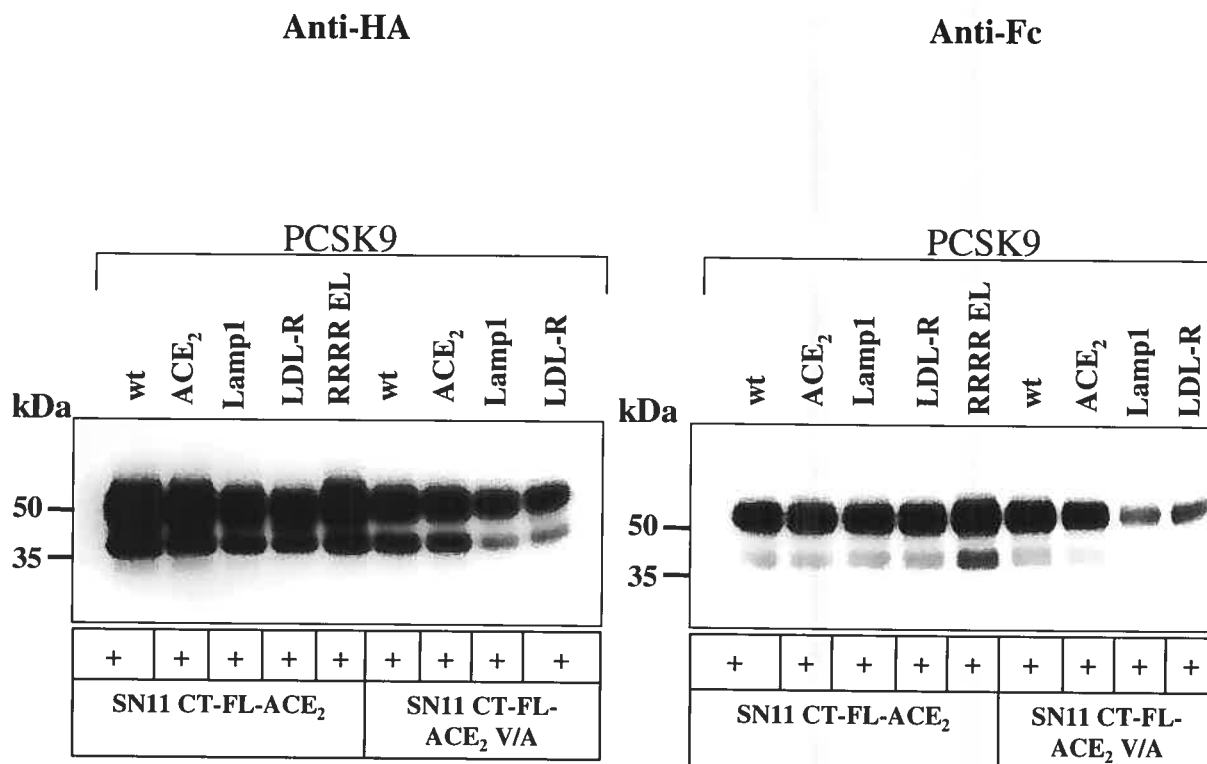


Figure 22 : Démonstration du clivage par PCSK9 dans les HuH7

Les cellules HuH7 furent transfectées transitoirement avec 25% d'ADNc des constructions *SN11/CT-FL-ACE₂* ou *SN11/CT-FL-ACE₂V/A* et 75% d'ADNc de différentes constructions de PCSK9 faites dans pIRES₂ EGFP. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP.

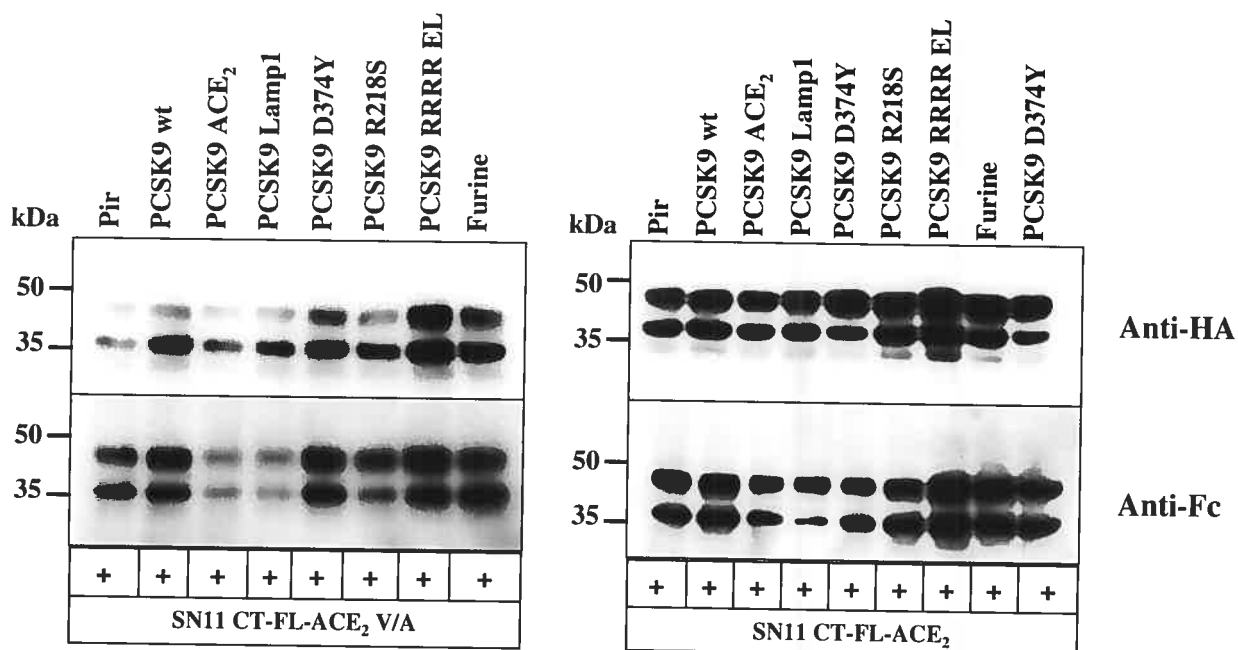


Figure 23 : Démonstration du clivage par PCSK9 dans les HepG2

Les cellules HepG2 furent transfectées transitoirement avec 25% d'ADNc des constructions *SN11CT-FL-ACE₂* ou *SN11CT-FL-ACE₂V/A* et 75% d'ADNc de différentes constructions de PCSK9 faites dans pIRES₂ EGFP. 30ug de lysat cellulaire furent déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. Les protéines furent détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-HA HRP et anti-Fc HRP.

Comme second contrôle nous avons effectué la même expérience, mais cette fois dans les HepG2. Cette expérience est décisive, car elle est faite dans les meilleures conditions dues au fait que la dégradation du LDL-R est la plus efficace dans ces cellules. Enfin, le fait que ces cellules se transfectent difficilement, nous aide à avoir une moins grande expression des chimères. Dans cette expérience nous avons omis l'utilisation de la construction PCSK9-LDL-R. Par contre, nous avons utilisé les mutants naturels hypercholestérolémiques de PCSK9 soit les mutants D374Y et R218S. La mutation D374Y est la mutation qui produit la plus grande dégradation du LDL-R. La mutation R218S a démontré la plus grande résistance à la dégradation par la Furine

menant ainsi à plus de PCSK9 actives dans la cellule. La **Figure 23** nous montre le résultat de l'expérience. Le gel anti-Fc nous confirme les différences de transfection d'une condition à l'autre. Ceci se reflète sur le gel anti-HA. Le plus surprenant dans ce cas est que la construction V/A est mieux clivée que la construction sauvage, et ce, malgré les différentes PCSK9 transfectées. Enfin, on voit que même quand on transfecte avec le vecteur vide pIRES, le V/A est mieux clivé que la construction sauvage. Comme contrôle, un test de séquençage a été effectué pour vérifier si une erreur de transfection n'aurait pas été commise. Le contrôle a démontré qu'il n'avait pas d'erreurs. Donc, on peut conclure que ce n'est pas PCSK9 qui clivait cette construction. Afin d'éclaircir cette situation, une expérience de biosynthèse fut effectuée.

3.5 Biosynthèse des protéines de fusion SN11CT-FL-ACE₂ et SN11 CT-FL-ACE₂ V/A.

La biosynthèse fut primordiale pour comprendre le phénomène qui se présentait à nous. On supposait qu'une activité enzymatique de la convertase PCSK9 sur notre construction était possible. Mais seule la relation de dégradation du LDL-R par la PCSK9 est un signe d'activité sans pour autant que ce soit une activité enzymatique. La biosynthèse au [³⁵S] Met/Cys fut faite sur des cellules HuH7 transfectées transitoirement avec les constructions SN11CT-FL-ACE₂ et SN11 CT-FL-ACE₂ V/A et avec le vecteur pcDNA₃ comme contrôle. Le premier gel (**Figure 24**) nous présente seulement un marquage de 4h. On voit que la construction mutante comme l'autre arrive au Golgi en perdant son épitope HA. Ceci démontre le manque de spécificité de clivage dans la cellule. On s'attendait ici à ce que la construction mutante V/A ne soit pas clivée. Ceci aurait résulté à obtenir une grosse bande HA (bande B) puisque PCSK9 aurait été incapable de la cliver. Une autre biosynthèse fut effectuée pour savoir où et quand le clivage se faisait dans la cellule. A la **Figure 25** on voit que le marquage de 30min et la chasse de 1h montrent que la coupure de l'épitope HA se fait très tôt. L'immunoprécipitation avec l'agarose couplé à anti-HA de la construction SN11CT-FL-ACE₂ montre qu'au bout de 30 min l'intensité du signal HA diminue d'environ 75% pour la bande du RE. En plus, les bandes supplémentaires inférieures à 35 kDa

disparaissent au bout de 30 min. L'immunoprécipitation à la protéine A/G agarose nous indique que la construction est fortement exprimée dans la cellule. Au bout d'une demi-heure une grande partie de la construction arrive au Golgi sans son épitope HA. On pourrait s'attendre ici que le niveau d'expression de la chimère soit tellement haut, qu'une bonne quantité de la construction arrive à atteindre la surface cellulaire sans être clivée. Il semble que l'épitope HA est assez stable et puisse s'accumuler après 24h sans être clivé.

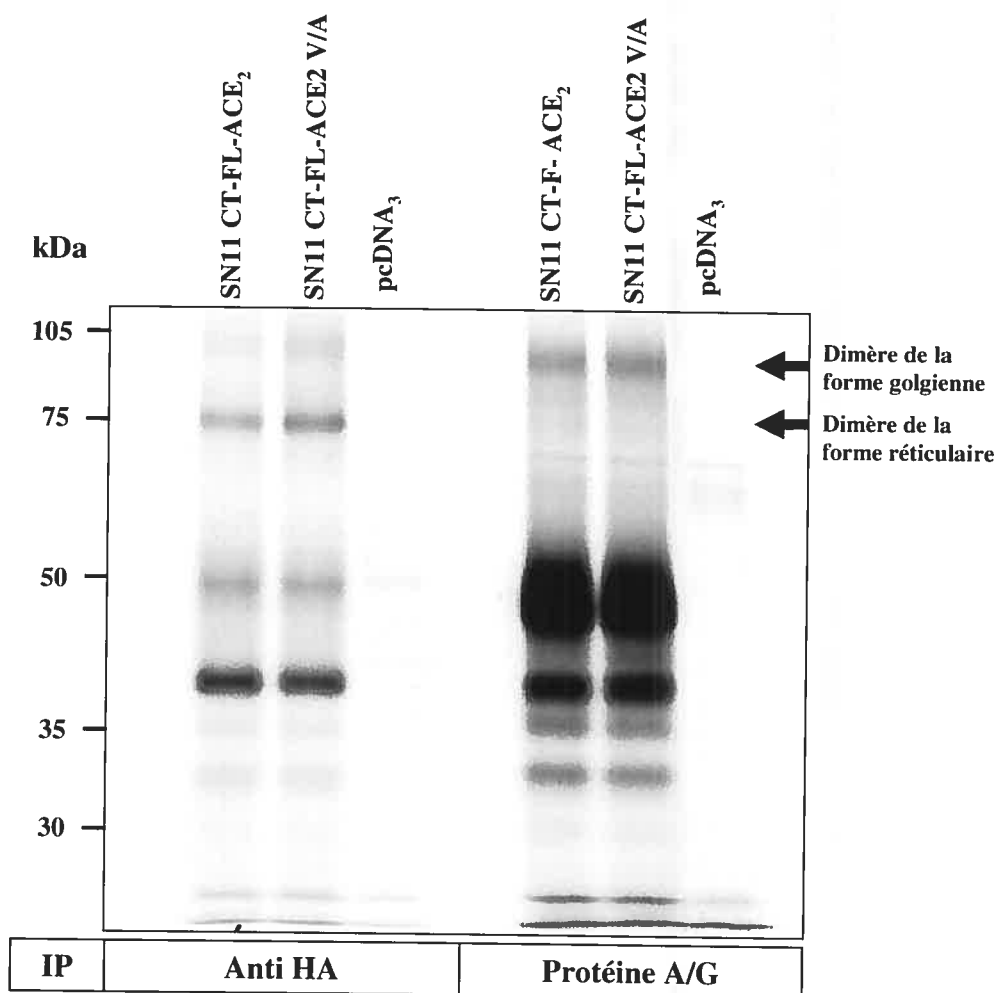


Figure 24 : Biosynthèse des *SNI1CT-FL-ACE₂* et *SNI1V/A CT-FL-ACE₂* dans les cellules HuH7

Les cellules HuH7 furent transfectées transitoirement avec le vecteur vide *pcDNA₃* (CTR-) ou avec les constructions *SNI1CT-FL-ACE₂* ou *SNI1V/ACT-FL-ACE₂* et furent marqué pendant 4h avec Met/Cys [³⁵S]. L'immunoprécipitation a été faite soit avec l'anti-HA couplé aux billes d'agarose ou avec la protéine A/G agarose.

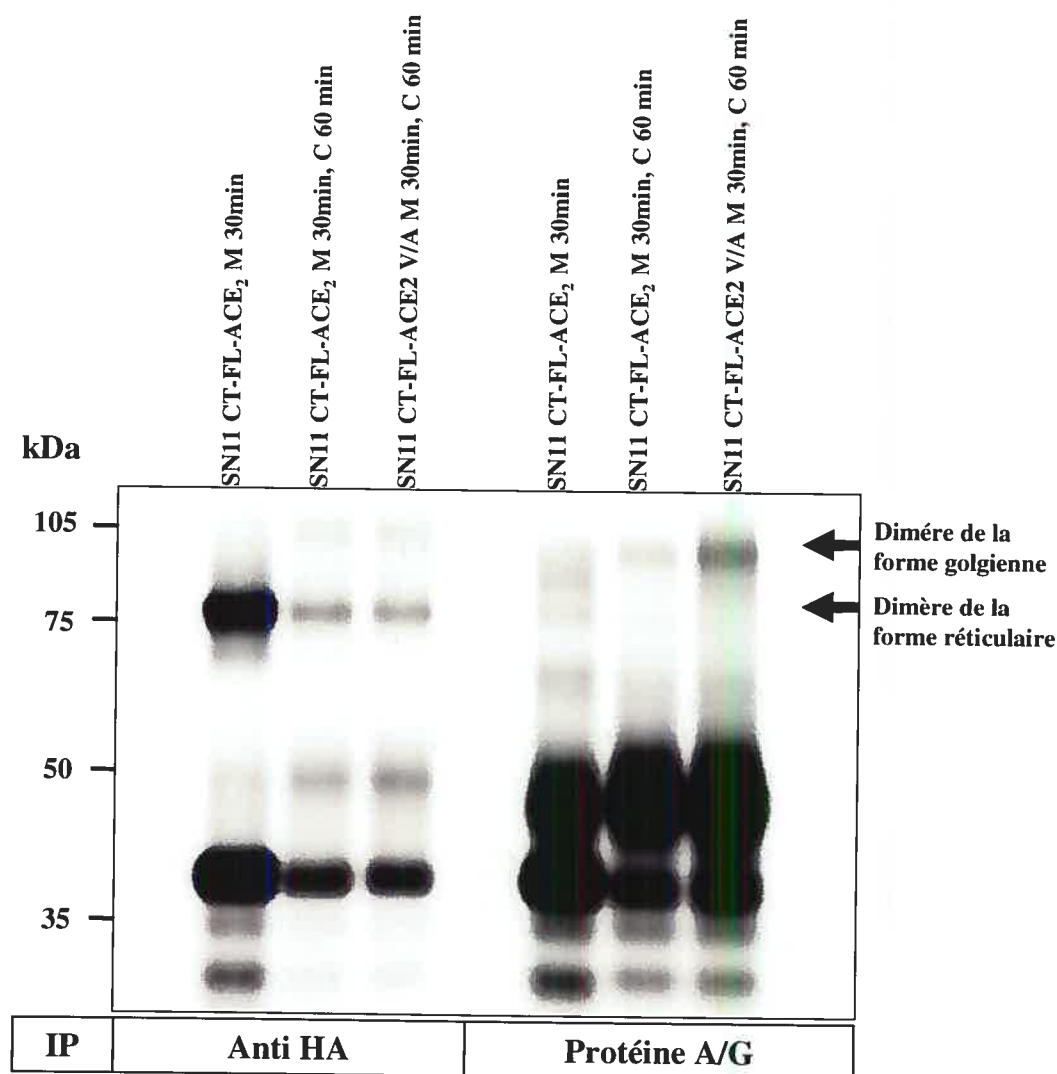


Figure 25 : Biosynthèse des *SNI1CT-FL-ACE₂* et *SNI1V/A CT-FL-ACE₂* dans les cell HuH7 avec des marquages et des chasses.

Les cellules HuH7 furent transfectées transitoirement avec le vecteur vide *pcDNA₃* (CTR-) ou avec les constructions *SNI1CT-FL-ACE₂* ou *SNI1V/ACT-FL-ACE₂* et furent marquée pendant 30min avec Met/Cys [³⁵S] suivie d'une chasse de 30 et 60 min. L'immunoprécipitation a été faite soit avec l'anti-HA couplé aux billes d'agarose ou avec la protéine A/G agarose. (1) *SNI1CT-FL-ACE₂* marquage de 30min, (2) *SNI1CT-FL-ACE₂* marquage de 30min et chasse de 60min, (3) *SNI1CT-FL-ACE₂* V/A marquage de 30min et chasse de 60min.

Discussion

Chapitre IV: Discussion

4.1 Caractérisation de la construction utilisée pour démontrer l'activité enzymatique de PCSK9.

Pour pouvoir démontrer une activité enzymatique de PCSK9, il fallait avant tout que la construction puisse être synthétisée comme une protéine de la voie sécrétoire. Ceci explique l'utilisation du peptide signal servant à diriger la synthèse de la protéine dans le RE après le début de la traduction. Nous remarquons aussi que cette protéine de fusion est bien maturée, puisque le corps Fc arrive à être très bien détecté par les anticorps anti-Fc autant dans sa forme non glycosylée au RE que dans sa forme mature au Golgi. Ceci explique les bandes B de plus hauts poids moléculaires sur les gels. Les expériences de biosynthèse nous ont même montré que ces constructions ont le potentiel de se dimériser (**Figure 24 et 25**). Cette caractéristique est bien connue des Fc des anticorps. La dimérisation des fragment Fc est stabilisée par la formation de pont disulfure. Cependant, ces formes ne sont pas vues lors d'un bW puisque les échantillons sont réduits auparavant et dénaturés. Ainsi la construction *SN1ICT-FL-ACE₂* et ses variantes, ont démontré beaucoup de potentiel dû à leur versatilité (il a été facile de changer la séquence variable pour le ciblage de PCSK9). Les constructions sont d'autant plus stables dans les cellules dues au corps Fc. Celui-ci nous a permis entre autres de faire plusieurs analyses tant en immunofluorescence, en bW, en biosynthèse qu'en CELISA. Le Fc nous permettait de déterminer le niveau d'expression de la construction dans les cellules. L'épitope HA nous a surtout permis de déterminer le niveau de clivage des constructions, lors de leur parcours dans la voie sécrétoire. L'épitope HA a montré une forte résistance à la dégradation ou au clivage non spécifique une fois la construction sortie du RE. Cette caractéristique permettait la détection des constructions non clivées permettant de faire un ratio entre le total exprimé et ceux clivés. La détection de ces constructions n'aurait pas été possible si elles n'avaient pas été bien exprimées dans l'ensemble des lignées cellulaires utilisées durant le projet. La queue complète d'ACE₂, ajoutée par la suite, fut très utile pour la sortie des constructions du RE. En effet, au début, ces constructions n'étaient munies

que de la partie transmembranaire d'ACE₂. Ceci avait pour conséquence un mauvais adressage de ces protéines de fusion vers la surface cellulaire, causant une séquestration dans le RE. La queue entière contient des séquences de type NPXY et YXXΦ permettant aux constructions d'être internalisées et de rejoindre PCSK9 dans les compartiments acides comme l'ont démontré les études de colocalisation par *Nassoury et al 2006*. Les études de biosynthèse ont montré que l'ensemble des constructions avaient tendance à subir une dégradation ou un clivage non spécifique durant leur synthèse dans le RE. En tant que telle, aucune étude approfondie n'a été effectuée pour comprendre ce phénomène. Notre but était plutôt de nous servir de cet outil pour détecter l'activité enzymatique de PCSK9. Il se peut qu'une plus grande connaissance du comportement de PCSK9 dans la cellule ait amélioré son utilisation. Une des hypothèses que l'on peut émettre est que les constructions sont fortement exprimées, favorisant des erreurs de repliement. Ces protéines mal repliées seraient par la suite dégradées par la machinerie de l'ERAD. Ceci amènerait premièrement à la dégradation de l'épitope HA pour finir par le Fc. Le Fc est plus long à dégrader dû aux multiples sites de glycosylation. Au bout de 24h, il y aurait une accumulation des constructions qui auraient échappé à cette dégradation pour aboutir à la surface cellulaire. Les bandes aperçues en bas de 35 kDa, par l'immunoprécipitation à la protéine A/G agarose, correspondraient aux premières constructions non complétées et mal repliées. On remarque que ces bandes perdent rapidement le signal anti HA malgré la persistance du Fc. Ceci démontre que l'épitope HA est le premier dégradé. C'est là qu'on voit l'utilité de la queue cytoplasmique entière d'ACE₂ car elle permet une meilleure sortie du RE pour ainsi échapper à la dégradation.

4.1.1 Le test colorimétrique et l'inhibiteur de PCSK9

La construction *SN11CT-FL-ACE₂* avait pour but d'être un outil de criblage d'une banque combinatoire de composés afin de trouver un inhibiteur possible de PCSK9. Une fois la construction transfectée dans les cellules HuH7 ou HepG2, celle-ci aurait été clivée par PCSK9 au niveau de la séquence variable SSVFAQSIWN. Cette construction serait arrivée à la surface cellulaire sans son épitope HA. Avec un

anticorps anti-HA couplé à la peroxydase, celui-ci aurait détecté les constructions qui n'auraient pas été clivées. En ajoutant le réactif de la peroxydase sur les cellules, il se serait formé un produit d'une couleur bleutée si plusieurs constructions n'avaient pas été clivées. Dans le cas contraire, toutes les constructions auraient été parfaitement clivées par PCSK9 et aucun produit ne serait obtenu. Si une drogue avait inhibé PCSK9, les cellules qui n'affichaient aucune couleur auraient de nouveau affiché la couleur bleutée correspondant au produit de la réaction avec la peroxydase couplée à l'anticorps. Afin d'améliorer davantage le test, on aurait fait un FACS pour trier les cellules qui expriment le mieux la construction et qui répondent le mieux au test. Ce test avait déjà été fait pour la Furine avec la séquence KRIRLRRSPD. Ce fut un succès, car la séquence était facilement reconnue par l'enzyme. Lors des expériences pour PCSK9, un CELISA a été effectué dans les cellules HuH7 avec la construction de la Furine comme contrôle, plus ou moins le décanoyl-RVKR-CMK (résultat non montré). Les cellules transfectées avec la construction de la Furine ont toutes été teintées par un bleu extrêmement pâle en absence de décanoyl-RVKR-CMK. En sa présence, il eut un revirement, le milieu cellulaire devint plus bleuté. Idéalement, nous voulions que la construction pour PCSK9 puisse répondre de cette manière. C'est pour cela que d'autres expériences ont été tentées pour mieux comprendre le phénomène. Cette construction a beaucoup de potentiel si l'on veut trouver des inhibiteurs pour d'autres enzymes. En changeant la séquence variable de la construction, on peut cibler d'autres protéines. Il serait intéressant de l'essayer pour les autres PCs mais aussi pour BACE (*β -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme*) l'enzyme qui clive l'APP (*Amyloid Precursor Protein*) pour donner A β (amyloid β) formant les plaques responsables de la maladie d'Alzheimer.

4.2 La problématique entre PCSK9 et la construction

On sait que PCSK9 transite dans la voie sécrétoire et on sait aussi qu'une grande partie de la construction *SN11CT-FL-ACE₂* arrive à échapper à la dégradation dans le RE sans perdre son épitope HA. La preuve en est que cette construction peut être décelée par les anticorps anti-Fc et HA autant en bW qu'en immunofluorescence. La

construction intacte, est donc incapable d'être reconnue et clivée, par la convertase PCSK9. Pourtant la construction faite pour la Furine, une fois sortie du RE, arrive à être détectée et clivée par celle-ci. Les multiples contrôles l'ont confirmé dans les résultats précédents et de plus un test colorimétrique fait en laboratoire (résultats non montrés) avec les cellules HuH7 (cellule hépatique ayant une très grande expression de la Furine) ont démontré que la Furine avait une grande affinité pour la construction puisque l'ensemble des cellules ne permettrait pas d'obtenir un produit coloré dans le milieu de culture. L'ajout de décanoyl-RVKR-CMK inhibe la Furine la rendant quasiment incapable de cliver sa construction. Le milieu cellulaire a repris une couleur bleutée. On suppose que PCSK9 est une PC ayant une activité enzymatique. Structuellement elle ressemble beaucoup aux PCs et comme celles-ci, elle autoclave son prosegment dans le RE. De plus, la mutation H226A, une mutation artificielle dans la triade catalytique, n'engendre que de la proPCSK9 inactive dans le RE (64). Ensuite, les substrats des PCs ont sensiblement la même séquence que celle reconnue dans leur prosegment. Ceci explique le choix de la séquence SSVFAQSIPWN (correspondant exactement à la séquence reconnue et clivée par PCSK9 au niveau de son prosegment pour son autoactivation) dans notre essai. Or jusqu'à présent, la seule véritable activité de PCSK9 décrite est l'accélération de la dégradation du LDL-R. Cependant, on ne parle pas d'une dégradation enzymatique dû à un clivage du LDL-R par la PCSK9, c'est tout simplement que l'expression de la convertase mène à une baisse du taux de LDL-R dans la cellule selon un mécanisme qui pourrait être indirect. Cette importante problématique peut grandement expliquer les raisons de l'échec de la démonstration de l'activité enzymatique de PCSK9 dans ce projet. Nous allons explorer plus en détail certains aspects de cette problématique afin d'expliquer les raisons de cet échec. Les aspects qui seront discutés sont en rapport avec le mécanisme de dégradation du LDL-R et du rôle de PCSK9 dans ce processus, de l'activité et de la régulation de PCSK9 dans la cellule, de sa colocalisation avec le LDL-R dans la cellule et enfin de la séquence reconnue comme substrat de PCSK9.

4.2.1 Mécanisme de dégradation du LDL-R par la PCSK9

Jusqu'à ce jour, le mécanisme de dégradation du LDL-R par PCSK9 n'a pas encore été élucidé. Plusieurs expériences *in vitro* et *ex vivo*, réalisées autant dans notre laboratoire que par certaines compagnies pharmaceutiques n'ont jamais abouti à démontrer une réelle activité enzymatique de PCSK9. Plusieurs hypothèses peuvent être envisageables. En tant que tel, on pourrait croire que cette convertase pourrait agir sur la dégradation du LDL-R par l'intermédiaire d'une autre protéine qui pourrait lui servir de substrat. Or aucun substrat n'a été trouvé jusqu'à présent. Mais cela ne veut pas dire qu'il n'y en a pas. Un des mécanismes de régulation des PCs est leur attachement à leur prosegment jusqu'à l'atteinte du bon compartiment leur donnant les bonnes conditions pour s'en détacher et s'activer. Dans ce cas, nous savons que PCSK9, une fois son prosegment clivé, sort du RE sous forme de PCSK9 inhibée par son prosegment qui lui est attaché de manière non-covalente. La PCSK9 est majoritairement sécrétée dans le milieu extracellulaire sous cette forme (64). Cependant, il faut que cette convertase arrive à se défaire de son prosegment pour qu'elle puisse s'activer. Dans les conditions de surexpression dans les lignées cellulaires, PCSK9 n'arrive pas à se défaire de son prosegment. Il se pourrait que PCSK9 ait un partenaire d'activation comme le ferait 7B2 pour PC2 ou une protéine comme un récepteur qui l'aiderait à se défaire de son prosegment. Une expérience en laboratoire a montré que le LDL-R pourrait être ce partenaire. Il a été découvert qu'en immunoprécipitant le LDL-R clivé et sécrété, ce dernier était attaché au prosegment de PCSK9 (donnée non publiée). Une autre hypothèse plausible est que le prosegment de PCSK9 soit son seul substrat. Il se pourrait qu'après son autoclivage, celle-ci joue un rôle indirect, mais important dans la dégradation du LDL-R. Dans ce cas, PCSK9 n'aurait de l'activité enzymatique que pour elle-même et non sur d'autres substrats. Toutes ces raisons pourraient expliquer pourquoi ces constructions n'ont pas subi de clivage par PCSK9.

4.2.2 PCSK9 et sa colocalisation avec le LDL-R

Dans notre construction, la partie cytoplasmique d'ACE₂ devait servir à colocaliser avec PCSK9 dans les compartiments acides tels que les endosomes tardifs afin qu'il puisse y avoir un clivage. Les motifs NPXY et YXXΦ contenus dans cette queue engendrent l'endocytose de cette construction dans les endosomes tardifs afin qu'elle puisse être dégradée. Pour ce qui est du LDL-R, son motif NPXY lui permet d'être endocyté avec ou sans LDL, afin qu'il puisse larguer le LDL et revenir à la surface pour le recyclage ou simplement pour être dégradé dans le lysosome. Un des inconnus est le nombre de fois que le LDL-R est recyclé à la surface cellulaire, c'est-à-dire le signal qui arrête ce recyclage pour l'envoyer en dégradation. Ce qui est sûr, c'est que PCSK9 doit jouer un rôle dans ce système de recyclage-dégradation. *Nasoury et al 2006* ont montré, par des expériences d'immunofluorescence, que PCSK9 colocalise avec le LDL-R quand ce dernier est transfecté transitoirement dans des cellules exemptes de LDL-R. Le LDL-R change le profil de localisation de PCSK9 pour le diriger dans les endosomes tardifs. Ceci démontre la relation étroite entre les deux protéines puisque l'une dirige l'autre. Or cela ne veut pas dire que cette convertase est active d'une manière enzymatique dans ces compartiments où elle colocalise avec le LDL-R. Dans notre cas, les expériences d'immunofluorescence de nos constructions dans les conditions perméabilisantes ont montré qu'elles pouvaient aussi être localisées dans ces compartiments. Cela n'a pas permis le clivage de la construction. Il serait important de vérifier si la chimère *SN11 CT-FL-ACE₂* colocalise dans les mêmes endosomes que PCSK9. D'une certaine manière, on voulait modeler cette construction sur le LDL-R. Si PCSK9 clivait spécifiquement notre construction, il devait aussi mener à la dégradation du LDL-R. Cependant, ce ne fut pas le cas. Ceci nous amène à se poser la question suivante, l'activité enzymatique de PCSK9 est-elle effectivement dans ces compartiments, ou n'est-elle pas ailleurs? Dans *Benjannet S et al 2004*, les auteurs montrent que l'autoactivation de PCSK9 n'est pas dépendante du calcium comme les autres PCs. L'autoactivation pourrait se faire dans un compartiment post-RE comme le Golgi. De plus, le mutant H226A démontre bien la nécessité d'une autoactivation post ER, car ce mutant non-actif est séquestré dans le RE. Donc, l'hypothèse d'une activité

de PCSK9 dans le Golgi semble très plausible, d'autant plus que pour entrer dans les endosomes tardifs, le passage par le Golgi est nécessaire. Finalement, la grande quantité de PCSK9 sécrétée dans le milieu extracellulaire doit avoir sa raison d'être du point de vue de son activité. Dans notre cas, notre construction a quand même visité tous les endroits possibles où PCSK9 pouvait être actif, mais aucun clivage ne s'est produit. Donc, la séquence mise dans la construction peut être mise en cause.

4.2.3 *L'activité et la régulation de PCSK9 dans la cellule*

On sait que la surexpression de PCSK9 est nécessaire à la dégradation du LDL-R endogène dans les lignées cellulaires Huh7 et HepG2 (64). Ceci suppose que la majorité de cette convertase, produite dans la cellule est inactivée. La surexpression aurait pour effet d'augmenter la quantité d'enzyme active. Or, on peut supposer qu'il y a une régulation fine de son activité. D'abord par son prosegment, mais aussi récemment par le clivage en position R²¹⁸ du domaine catalytique de PCSK9 par la Furine (et par PC5 dans une moindre mesure) (78). Ceci génère des formes clivées de PCSK9 pouvant être décelées dans le sérum humain. Un mutant artificiel de PCSK9 avec un site RRRR EL serait encore mieux clivé par la Furine que le type sauvage, ceci étant un contrôle positif. De plus, le mutant naturel hypercholestérolémique R218S, aurait une résistance à ce clivage (78). Ceci explique l'utilisation du décanoyl-RVKR-CMK afin d'inhiber la Furine dans nos expériences pour augmenter la quantité de PCSK9 active. Autrement, il est possible que PCSK9 soit une enzyme dont peu de molécules sont actives. Ainsi, la détection d'une activité enzymatique endogène serait très difficile. Dans ce cas, la détection d'un clivage par PCSK9 sur la construction serait quasi impossible dû au fait que cette construction est très surexprimée et voyage très rapidement dans la voie sécrétoire. Ceci mène à une saturation du système enzyme-substrat puisqu'une petite partie est occupée à se faire cliver par le peu d'enzyme active et une grande partie des constructions lui échappent en allant rapidement à la surface cellulaire. Dans ce cas, la quantité de substrats présentés à PCSK9 dépasse le K_m de l'enzyme. Donc, nous sommes dans un cas où l'enzyme atteint un V_{max} qui est très petit. Mais on peut aussi interpréter cela en se disant que la construction est peut-être un

mauvais substrat ou, à la rigueur, un inhibiteur de l'enzyme. En étant un mauvais substrat, l'enzyme a de la difficulté à réaliser le clivage. La séquence que l'on a utilisée pour la détection enzymatique est une séquence de PCSK9. C'est comme si l'on demandait à une PCSK9 d'en activer une autre, mais en *trans*. Jusqu'à présent, il n'a jamais été démontré que cette convertase, ainsi que les autres PCs pouvaient s'activer mutuellement. Il est possible que cette construction soit un inhibiteur, car la séquence utilisée vient de son prosegment. Nous savons que ce dernier a la propriété d'inhiber les PCs en général ainsi que PCSK9 (49). Ceci suggère, que tout en n'ayant pas un effet d'inhibition, la construction est un mauvais substrat de PCSK9 endogène. Donc, l'ajout de cette construction dans les cellules devrait en quelque sorte augmenter le LDL-R des cellules puisque la PCSK9 endogène serait inhibée. Un contrôle anti-LDL-R fait sur le premier gel du premier résultat de ce projet ne nous montre aucune augmentation du LDL-R endogène des cellules HuH7 suite à la transfection transitoire des constructions FC-ACE₂-Fusion (résultat non montré).

4.2.4 La séquence reconnue comme substrat de PCSK9

Le substrat de PCSK9 n'est pas encore connu. Seul son prosegment est clivé. Dans notre cas, il y a deux raisons qui peuvent expliquer pourquoi la séquence de notre construction n'a pas été reconnue par la convertase. En premier, il se peut que cette séquence ne corresponde pas à celle du vrai substrat de PCSK9. Alors, contrairement aux autres PCs, la séquence de son substrat serait différente de celle de son prosegment. Deuxièmement, il se pourrait que cette séquence soit bonne, mais qu'elle n'ait pas la bonne structure tridimensionnelle une fois incrustée dans cette construction. Pour répondre à ce problème, il aurait fallu faire une étude tridimensionnelle de l'ensemble de la construction basée sur le crystal de PCSK9 pour que cette séquence, une fois dans la construction, adopte la même conformation que l'original. Or cette structure tridimensionnelle n'est pas encore disponible. Une des possibilités que nous avons testées était de rallonger la séquence de 11 à 27 acides aminés. La séquence utilisée fut PHVDYIEEDSSVFAQSIPWNLERITPP. Nous avons rallongé la séquence pour avoir, de part et d'autre, des résidus prolines afin que cette séquence puisse être isolée et ne

pas subir l'influence de l'épitope HA et du corps Fc. De plus, on a même fait le mutant V/A. Les résultats ne démontraient aucune différence par rapport aux autres résultats (résultat non montré). Ceci suggère que la séquence du prosegment n'est pas un substrat de PCSK9 en *trans*, de par sa structure en 3D (effet de la construction) ou de sa séquence qui n'est pas celle du substrat naturel. Par ailleurs, il est possible que la séquence du site de clivage du substrat de PCSK9 soit semblable à celle d'un deuxième site de clivage dans le prosegment de PCSK9, qui est retrouvé dans plusieurs PCs.

Conclusions

Conclusions

La construction *SNIICT-FL-ACE₂* a démontré un grand potentiel d'utilisation. Son grand niveau d'expression, sa versatilité, sa stabilité et sa détection en font une construction très prometteuse. Les améliorations faites au niveau de la queue C-terminale ont amélioré sa sortie du RE tout en diminuant sa dégradation et ont aussi amélioré son adressage à la surface cellulaire. Une étude un peu plus poussée au niveau de sa conformation aidera à faire les bons choix de séquence cible afin que ceux-ci puissent avoir la conformation tridimensionnelle originale sans pour autant subir l'influence du corps Fc et de l'épitope HA. Nous avons vu son succès pour la Furine; or pour les autres enzymes, un remodelage est de mise. Une amélioration pourrait être portée sur la détection des constructions clivées et non clivées. En tant que tel, le poids moléculaire entre les deux formes n'est pas facile à distinguer en bW. En changeant l'épitope HA pour un épitope plus long, ou en mettant une séquence de quelques acides aminés après l'épitope HA, on facilitera la distinction des deux formes sans pour autant nuire à sa détection. Dépendamment de l'enzyme ciblé, il faudrait aussi ajuster le niveau d'expression de la construction, soit en l'exprimant moins ou en utilisant un promoteur eucaryote moins fort. Il faut aussi faire le bon choix cellulaire. Pour la construction ciblée pour la Furine, celle-ci fut très bien clivée par cette convertase, parce qu'elle est fortement exprimée dans plusieurs types cellulaires et qu'elle a une grande activité enzymatique naturellement.

Le but était d'utiliser cette construction comme un substrat de PCSK9 afin d'identifier un inhibiteur potentiel. Les bénéfices de son inhibition face à l'hypercholestérolémie familiale ne font aucun doute. PCSK9 reste encore énigmatique. On la considère comme une PC à cause de sa structure et de son autoactivation. Cependant, elle diffère du point de vue de son activité enzymatique et de son mode d'action. Le mécanisme de dégradation du LDL-R par PCSK9 sera un enjeu important dans les recherches futures. Cependant, on essaie de comprendre ce mécanisme en se disant au départ que PCSK9 est une enzyme. Il est sûr qu'elle est une enzyme pour elle-même, car elle s'autoclive. Mais est-elle une enzyme par la suite? Pour pouvoir

démontrer cela, il est primordial de découvrir le bon substrat qui pourra nous révéler son activité enzymatique *in vitro*. De plus, il est possible que la séquence reconnue dans le substrat diffère de celle du prosegment. Il est sûr que la découverte du ou des substrats/partenaires de PCSK9 ouvrira la porte à son inhibition. De là, la construction FC-ACE₂-Fusion sera de nouveau d'une grande utilité. Dans notre cas si l'on n'a pas pu détecter de l'activité enzymatique, c'est en partie à cause de la séquence utilisée. Mais il est bien probable que PCSK9 n'agirait pas *en trans* sur d'autres substrats, car elle reste sous forme inhibée par son prosegment.

Bibliographie

Bibliographie

1. Molecular Biology of the Cell 4th ed, A., Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter New York and London: Garland Science; c (2002)
2. Kalies, K. U., and Hartmann, E. (1998) Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes, *European journal of biochemistry / FEBS* 254, 1-5.
3. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nature reviews* 4, 181-191.
4. Trombetta, E. S. (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis, *Glycobiology* 13, 77R-91R.
5. Barlowe, C. (2002) COPII-dependent transport from the endoplasmic reticulum, *Current opinion in cell biology* 14, 417-422.
6. Duben. (2003) ER-To-Golgi transport: COPI and COPII function, *Mol. Mem. biol* 20, 197-207.
7. Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway, *Science* 286, 1882-1888.
8. Storrie, B., and Nilsson, T. (2002) The Golgi apparatus: balancing new with old, *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3, 521-529.
9. Shinde, U., and Inouye, M. (2000) Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding, *Seminars in cell & developmental biology* 11, 35-44.
10. Seidah, N. G., and Chretien, M. (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides, *Brain research* 848, 45-62.
11. Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes, *Annual review of biochemistry* 72, 395-447.
12. <http://nobelprize.org>.
13. Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways, *Annual review of cell and developmental biology* 14, 19-57.

14. Pagano, M. (1997) Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway, *Faseb J* 11, 1067-1075.
15. Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006) The ubiquitin-proteasome system, *Journal of biosciences* 31, 137-155.
16. Thomas, G., Thorne, B. A., Thomas, L., Allen, R. G., Hruby, D. E., Fuller, R., and Thorner, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells, *Science* 241, 226-230.
17. Steiner, D. F., Smeekens, S. P., Ohagi, S., and Chan, S. J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases, *The Journal of biological chemistry* 267, 23435-23438.
18. Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor, *Cell* 37, 1075-1089.
19. Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3564-3568.
20. Seidah. (2001) Cellular limited proteolysis of precursor protein and peptides, *The enzyme* 22, 237-258.
21. Rouille, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A. A., Jr., Chan, S. J., and Steiner, D. F. (1995) Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases, *Frontiers in neuroendocrinology* 16, 322-361.
22. Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease, *Nature reviews* 3, 753-766.
23. Muller, L., Cameron, A., Fortenberry, Y., Apletalina, E. V., and Lindberg, I. (2000) Processing and sorting of the prohormone convertase 2 propeptide, *The Journal of biological chemistry* 275, 39213-39222.
24. Paquet, L., Bergeron, F., Boudreault, A., Seidah, N. G., Chretien, M., Mbikay, M., and Lazure, C. (1994) The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase, *The Journal of biological chemistry* 269, 19279-19285.
25. Lipkind, G. M., Zhou, A., and Steiner, D. F. (1998) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7310-7315.

26. Ueda, K., Lipkind, G. M., Zhou, A., Zhu, X., Kuznetsov, A., Philipson, L., Gardner, P., Zhang, C., and Steiner, D. F. (2003) Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5622-5627.
27. Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., and Steiner, D. F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases, *The Journal of biological chemistry* 273, 11107-11114.
28. Seidah, N. G., Benjannet, S., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Basak, A., Marcinkiewicz, J., Mbikay, M., Chretien, M., and Marcinkiewicz, M. (1999) The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1, *Annals of the New York Academy of Sciences* 885, 57-74.
29. Tsuji, A., Sakurai, K., Kiyokage, E., Yamazaki, T., Koide, S., Toida, K., Ishimura, K., and Matsuda, Y. (2003) Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix, *Biochimica et biophysica acta* 1645, 95-104.
30. Molloy SS, T. G. (2001) Furine, *The enzymes* 22, 199-235.
31. Xiang, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., and Thomas, G. (2000) The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments, *Molecular biology of the cell* 11, 1257-1273.
32. Blazquez M, S. K. (2000) Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway, *Biochem Cell Biol* 78, 181-191.
33. Creemers, J. W., Usac, E. F., Bright, N. A., Van de Loo, J. W., Jansen, E., Van de Ven, W. J., and Hutton, J. C. (1996) Identification of a transferable sorting domain for the regulated pathway in the prohormone convertase PC2, *The Journal of biological chemistry* 271, 25284-25291.
34. Jutras, I., Seidah, N. G., and Reudelhuber, T. L. (2000) A predicted alpha -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway, *The Journal of biological chemistry* 275, 40337-40343.
35. Taniguchi, T., Kuroda, R., Sakurai, K., Nagahama, M., Wada, I., Tsuji, A., and Matsuda, Y. (2002) A critical role for the carboxy terminal region of the proprotein convertase, PACE4A, in the regulation of its autocatalytic activation coupled with secretion, *Biochemical and biophysical research communications* 290, 878-884.

36. Denault, J., Bissonnette, L., Longpre, J., Charest, G., Lavigne, P., and Leduc, R. (2002) Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region, *FEBS Lett* 527, 309-314.
37. van de Loo, J. W., Creemers, J. W., Bright, N. A., Young, B. D., Roebroek, A. J., and Van de Ven, W. J. (1997) Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase, *The Journal of biological chemistry* 272, 27116-27123.
38. van de Loo, J. W., Teuchert, M., Pauli, I., Plets, E., Van de Ven, W. J., and Creemers, J. W. (2000) Dynamic palmitoylation of lymphoma proprotein convertase prolongs its half-life, but is not essential for trans-Golgi network localization, *The Biochemical journal* 352 Pt 3, 827-833.
39. Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J. M., and Seidah, N. G. (1996) Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines, *The Journal of biological chemistry* 271, 30442-30450.
40. Bergeron, E., Vincent, M. J., Wickham, L., Hamelin, J., Basak, A., Nichol, S. T., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2005) Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Biochemical and biophysical research communications* 326, 554-563.
41. Friedman, T. C., Gordon, V. M., Leppla, S. H., Klimpel, K. R., Birch, N. P., and Loh, Y. P. (1995) In vitro processing of anthrax toxin protective antigen by recombinant PC1 (SPC3) and bovine intermediate lobe secretory vesicle membranes, *Archives of biochemistry and biophysics* 316, 5-13.
42. Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M., and Chretien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences* 839, 9-24.
43. Khatib, A. M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P., and Seidah, N. G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy, *The American journal of pathology* 160, 1921-1935.
44. Cameron A, A. E., Lindberg I. (2001) The enzymology of PC1 and PC2, *The enzymes* 22, 291-332.
45. Zhu, X., Rouille, Y., Lamango, N. S., Steiner, D. F., and Lindberg, I. (1996) Internal cleavage of the inhibitory 7B2 carboxyl-terminal peptide by PC2: a potential mechanism for its inactivation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4919-4924.

46. Fricker, L. D., McKinzie, A. A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S. D., Courchesne, P. L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, L. A., and Douglass, J. (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing, *J Neurosci* 20, 639-648.
47. Basak, A., Koch, P., Dupelle, M., Fricker, L. D., Devi, L. A., Chretien, M., and Seidah, N. G. (2001) Inhibitory specificity and potency of proSAAS-derived peptides toward proprotein convertase 1, *The Journal of biological chemistry* 276, 32720-32728.
48. Fortenberry, Y., Hwang, J. R., Apletalina, E. V., and Lindberg, I. (2002) Functional characterization of ProSAAS: similarities and differences with 7B2, *The Journal of biological chemistry* 277, 5175-5186.
49. Zhong, M., Munzer, J. S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S. J., Decroly, E., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1999) The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity, *The Journal of biological chemistry* 274, 33913-33920.
50. Nour, N., Mayer, G., Mort, J. S., Salvas, A., Mbikay, M., Morrison, C. J., Overall, C. M., and Seidah, N. G. (2005) The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases, *Molecular biology of the cell* 16, 5215-5226.
51. Fugere, M., and Day, R. (2002) Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs), *Current pharmaceutical design* 8, 549-562.
52. Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., and Whisstock, J. C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature, *The Journal of biological chemistry* 276, 33293-33296.
53. Owen, M. C., Brennan, S. O., Lewis, J. H., and Carrell, R. W. (1983) Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder, *The New England journal of medicine* 309, 694-698.
54. Jean, F., Stella, K., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Reason, A. J., and Thomas, G. (1998) alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7293-7298.

55. Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J. S., Chretien, M., Marcinkiewicz, M., and Seidah, N. G. (1997) Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway, *The Journal of biological chemistry* 272, 26210-26218.
56. Tsuji, A., Hashimoto, E., Ikoma, T., Taniguchi, T., Mori, K., Nagahama, M., and Matsuda, Y. (1999) Inactivation of proprotein convertase, PACE4, by alpha1-antitrypsin Portland (alpha1-PDX), a blocker of proteolytic activation of bone morphogenetic protein during embryogenesis: evidence that PACE4 is able to form an SDS-stable acyl intermediate with alpha1-PDX, *Journal of biochemistry* 126, 591-603.
57. Elagoz, A., Benjannet, S., Mammabassi, A., Wickham, L., and Seidah, N. G. (2002) Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity, *The Journal of biological chemistry* 277, 11265-11275.
58. Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Toure, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J. C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chretien, M., and Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1321-1326.
59. Pullikotil, P., Vincent, M., Nichol, S. T., and Seidah, N. G. (2004) Development of protein-based inhibitors of the proprotein of convertase SKI-1/S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein, *The Journal of biological chemistry* 279, 17338-17347.
60. Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005) OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes, *Nature cell biology* 7, 186-194.
61. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11041-11048.
62. Feramisco, J. D., Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Reitz, J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2005) Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3242-3247.
63. DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Espenshade, P. J. (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi, *Cell* 99, 703-712.

64. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brisette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol, *The Journal of biological chemistry* 279, 48865-48875.
65. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 928-933.
66. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derre, A., Villeger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia, *Nature genetics* 34, 154-156.
67. Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I. K., Graham, R., Garcia, C. K., and Hobbs, H. H. (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9, *Nature genetics* 37, 161-165.
68. Leren, T. P. (2004) Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia, *Clinical genetics* 65, 419-422.
69. Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C. F., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. A., Jacobsen, J. S., Kennedy, J. D., DiStefano, P. S., Wood, A., and Bingham, B. (2003) Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K, *Archives of biochemistry and biophysics* 420, 55-67.
70. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science* 232, 34-47.
71. Varret, M., Rabes, J. P., Saint-Jore, B., Cenarro, A., Marinoni, J. C., Civeira, F., Devillers, M., Krempf, M., Coulon, M., Thiart, R., Kotze, M. J., Schmidt, H., Buzzzi, J. C., Kostner, G. M., Bertolini, S., Pocovi, M., Rosa, A., Farnier, M., Martinez, M., Junien, C., and Boileau, C. (1999) A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32, *American journal of human genetics* 64, 1378-1387.
72. Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., and Shattuck, D. M. (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree, *Human genetics* 114, 349-353.

73. Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2069-2074.
74. Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., and Breslow, J. L. (2003) Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice, *Journal of lipid research* 44, 2109-2119.
75. Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12027-12032.
76. Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L., and Prat, A. (2004) Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1454-1459.
77. Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5374-5379.
78. Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications, *The Journal of biological chemistry* 281, 30561-30572.
79. Wall, R., and Kuehl, M. (1983) Biosynthesis and regulation of immunoglobulins, *Annual review of immunology* 1, 393-422.
80. Fantus, I. G., George, R., Tang, S., Chong, P., and Poznansky, M. J. (1996) The insulin-mimetic agent vanadate promotes receptor endocytosis and inhibits intracellular ligand-receptor degradation by a mechanism distinct from the lysosomotropic agents, *Diabetes* 45, 1084-1093.
81. Molecular Cell Biology. 4th ed, L., Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; c (2000).
82. Schechter and Berger (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain *Biochemical and biophysical research communications*.27:157-162.